

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – UNIOESTE  
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO “STRICTO SENSU” EM  
ENGENHARIA QUÍMICA – NÍVEL DE DOUTORADO

**COMPOSTOS ANTIOXIDANTES E QUANTIFICAÇÃO DO EUGENOL DE  
EXTRATOS DAS FOLHAS DE CRAVO DA ÍNDIA (*Syzygium aromaticum*)  
OBTIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO**

PAULA CASSIANA FROHLICH

**TOLEDO – PR  
Maio de 2023**

**PAULA CASSIANA FROHLICH**

**COMPOSTOS ANTIOXIDANTES E QUANTIFICAÇÃO DO EUGENOL DE  
EXTRATOS DAS FOLHAS DE CRAVO DA ÍNDIA (*Syzygium aromaticum*)  
OBTIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração em **Desenvolvimento de Processos.**

Orientador: Prof. Dr. Edson Antônio da Silva  
Coorientadora: Dra. Kátia Andressa Santos

**TOLEDO – PR  
Maio de 2023**

## AGRADECIMENTOS

- A Deus, a Ele que sustentou minha mente e meu corpo em todos os momentos da minha vida.
- Em especial a meus pais, Nádía Lopes Frohlich e Jayme Frohlich, pela vida, por todo amor, suporte e incentivo para nunca desistir.
- Ao meu esposo, Andre Luis Lowe, por me apoiar nas ocasiões decisivas da minha vida acadêmica, pela paciência, carisma de sempre e pelo grande presente em nossas vidas, Davi Miguel Lowe, nosso filho.
- A todos os meus familiares por sempre me apoiar e incentivarem nos estudos.
- Ao professor Edson Antônio da Silva, pela excelente orientação e compreensão na minha vida acadêmica.
- A professora Jociani Ascari, por permitir a realização de análises no Laboratório de Química da UTFPR.
- Aos meus amigos de laboratório e dos corredores da universidade, em especial a Kátia A. Santos, por toda ajuda no desenvolvimento do estudo, amizade e cumplicidade construída no decorrer desses anos e a Carina C. Triques, por todo suporte, devido a minha distância até o campus.
- A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, por todo ensinamento passado nesses anos.
- A minha amiga Luana, obrigada por sempre estar disposta a me ouvir nos momentos de desânimo.
- A todos que participaram ativa ou passivamente durante este meu aprendizado.

Muito Obrigada!

## SUMARIO

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>ii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>iii</b>
<b>LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS.....</b>	<b>vi</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>vi</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
2.1 Objetivo geral .....	14
2.2 Objetivos Específicos .....	14
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>15</b>
3.1 Cravo da Índia ( <i>Syzygium aromaticum</i> ).....	15
3.2 Eugenol .....	16
3.3 Métodos de extrações .....	18
3.3.1 Extração assistida por ultrassom (UAE) .....	21
3.3.2 Extração com fluido supercrítico.....	23
3.3.3 Extração com líquido pressurizado.....	26
3.4 Atividade antioxidante.....	28
3.5 Considerações parciais .....	30
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
4.1 Produtos químicos e reagentes .....	32
4.2 Preparação das folhas de cravo para extração .....	32
4.3 Métodos de extração .....	33
4.3.1 Extração convencional – Soxhlet.....	33
4.3.2 Extração assistida por ultrassom com solvente etanol .....	33
4.3.3 Extração convencional – Maceração dinâmica.....	34
4.3.4 Extração com CO <sub>2</sub> supercrítico.....	35
4.3.5 Extração com líquido pressurizado –PLE .....	36
4.4 Caracterização da amostra.....	37
4.4.1 Quantificação do Eugenol.....	37
4.4.2 Determinação da atividade antioxidante .....	37
4.4.2.1 Determinação pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).....	37
4.4.2.2 Determinação pela redução de ferro (FRAP) .....	37
4.4.2.3 Quantificação dos compostos fenólicos.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.5 Análises Estatística .....	38
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>

5.1 Caracterização das folhas de cravo da Índia.....	38
5.2 Métodos de Extração.....	39
5.2.1 Método convencional – Soxhlet.....	39
5.2.2 Extração Assistida por ultrassom e Maceração.....	41
5.2.2.1 Rendimento .....	41
5.2.2.1.1 Efeito do tempo (min) .....	45
5.2.2.1.2 Efeito da amplitude (%) .....	46
5.2.2.1.3 Efeito da razão/solvente (mL g <sup>-1</sup> ).....	47
5.2.2.1.4 Efeito da temperatura (°C).....	48
5.2.2.2 Otimização do Processo.....	48
5.2.2.3 Rendimento de eugenol.....	49
5.2.2.4 Teor de compostos fenólicos (TCF) e atividade antioxidante (DPPH e FRAP) .....	53
5.2.3 Extração por Líquido Pressurizado.....	59
5.2.3.1 Rendimento .....	59
5.2.3.2 Rendimento de eugenol.....	61
5.2.3.3 Teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante (DPPH e FRAP).....	62
5.2.4 Extração com CO <sub>2</sub> Supercrítico .....	64
5.2.4.1 Rendimento .....	64
5.2.4.2 Rendimento de eugenol.....	67
5.2.4.3 Teor de compostos fenólicos e capacidade antioxidante (DPPH e FRAP).....	69
5.3 Comparação entre as técnicas de CO <sub>2</sub> supercrítico, PLE e UAE.....	70
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>753</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>75</b>
<b>8 ANEXOS.....</b>	<b>97</b>
8.1 ANEXO I - Artigos Publicados em Periódicos.....	97

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 5.1.</b> Condições empregadas, polaridade dos solventes e rendimentos obtidos nas extrações por Soxhlet com solventes orgânicos .....	40
<b>Tabela 5.2.</b> Condições experimentais e rendimentos, obtidos pela extração assistida por ultrassom e maceração. ....	42
<b>Tabela 5.3.</b> ANOVA para o modelo quadrático de rendimento do planejamento CCD. ....	44
<b>Tabela 5.4.</b> Rendimento do extrato de folha de cravo obtido pela extração assistida por ultrassom, com etanol como solvente. ....	49
<b>Tabela 5.5.</b> Condições experimentais, teor e rendimento de eugenol obtidos pela extração assistida por ultrassom e maceração .....	49
<b>Tabela 5.6.</b> Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos das folhas de cravo da Índia extraídos por ultrassom e maceração com etanol	54
<b>Tabela 5.7.</b> p-valores da análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos na matriz do desing do composto central para as variáveis TCF, DPPH e FRAP.....	59
<b>Tabela 5.8.</b> Condições experimentais e rendimentos das extrações obtidos por PLE das folhas de cravo da Índia.....	60
<b>Tabela 5.9.</b> Resultado da concentração de eugenol dos extratos das folhas de cravos extraídos por PLE com etanol.....	61
<b>Tabela 5.10.</b> Valores de TPC, DPPH and FRAP dos extratos das folhas de cravo obtido por PLE.....	62
<b>Tabela 5.11.</b> Condições experimentais e rendimentos obtidos pela extração com CO <sub>2</sub> supercrítico. ....	64
<b>Tabela 5.12.</b> Compostos eugenol encontrado nos extratos de cravo da Índia obtido por CO <sub>2</sub> supercrítico em diferentes condições experimentais. ....	68
<b>Tabela 5.13.</b> Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (DPPH e FRAP) dos extratos das folhas de cravo obtidos por CO <sub>2</sub> supercrítico. ....	69

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1.</b> (A): Árvore de Cravo da Índia; (B): Folhas de cravo da Índia. ....	16
<b>Figura 3.2.</b> Estrutura molecular do eugenol.....	17
<b>Figura 3.3.</b> (A) Banho ultrassônico com sonda. (B) Ultrassom de banho. ....	22
<b>Figura 3.4.</b> Diagrama de fases típico para um composto puro. (Adaptado de: (Herrero; Cifuentes; Ibañez, 2006)) ..... <b>Erro! Indicador não definido.</b>	23
<b>Figura 3.5.</b> Módulo de extração supercrítico: A: Cilindro de gás. B: Bomba seringa; C: Extrator. D e E: Banhos termostático. F: Controlador de temperatura na válvula micrométrica. G: Coletor de extrato. V1, V2, V3 e V4 válvulas agulha.....	24
<b>Figura 5.1.</b> Superfície de resposta ilustrando os efeitos das variáveis independentes no rendimento da extração assistida por ultrassom. <b>A:</b> Variáveis: x1 (tempo) e x2 (amplitude) e constante x3 (25 mL g <sup>-1</sup> ) e x4 (50 °C). <b>B:</b> Variáveis: x1 (tempo) e x3 (solvente/amostra) e constante x2 (55%) e x4 (50 °C). <b>C:</b> Variáveis: x1 (tempo) e x4 (temperatura) e constante x3 (25 mL g <sup>-1</sup> ) e x2 (55%). <b>D:</b> Variáveis: x2 (amplitude) e x3 (solvente/amostra) e constante x1 (15 min) e x4 (50 °C). <b>E:</b> Variáveis: x2 (amplitude) e x4 (temperatura) e constante x3 (25 mL g <sup>-1</sup> ) e x1 (15 min). <b>F:</b> x3 (solvente/amostra) e x4 (temperatura) e constante x1 (15 min) e x2 (55%).....	45
<b>Figura 5.2.</b> Superfície de respostas para rendimento de eugenol. A: Variáveis: x1 (tempo) e x2 (amplitude) e constante x3 (25 mL g <sup>-1</sup> ) e x4 (50 °C). B: Variáveis: x1 (tempo) e x3 (solvente/amostra) e constante x2 (55%) e x4 (50 °C). C: Variáveis: x1 (tempo) e x4 (temperatura) e constante x3 (25 mL g <sup>-1</sup> ) e x2 (55%). <b>D:</b> Variáveis: x2 (amplitude) e x3 (solvente/amostra) e constante x1 (15 min) e x4 (50 °C). <b>E:</b> Variáveis: x2 (amplitude) e x4 (temperatura) e constante x3 (25 mL g <sup>-1</sup> ) e x1 (15 min). <b>F:</b> x3 (solvente/amostra) e x4 (temperatura) e constante x1 (15 min) e x2 (55%).....	52
<b>Figura 5.3.</b> Superfície de Resposta para DPPH. A: Variáveis: x1 (tempo) e x2 (amplitude) e constante x3 (25 mL g <sup>-1</sup> ) e x4 (50 °C). B: Variáveis: x1 (tempo) e x3 (solvente/amostra) e constante x2 (55%) e x4 (50 °C). C: Variáveis: x1 (tempo) e x4 (temperatura) e constante x3 (25 mL g <sup>-1</sup> ) e x2 (55%). <b>D:</b> Variáveis: x2 (amplitude) e x3 (solvente/amostra) e constante x1 (15 min) e x4 (50 °C). <b>E:</b> Variáveis: x2 (amplitude) e x4 (temperatura) e constante x3 (25 mL g <sup>-1</sup> ) e x1 (15 min). <b>F:</b> x3 (solvente/amostra) e x4 (temperatura) e constante x1 (15 min) e x2 (55%). ....	55

**Figura 5.4.** Superfície de Resposta para TCF. A: Variáveis:  $x_1$  (tempo) e  $x_2$  (amplitude) e constante  $x_3$  (25 mL g<sup>-1</sup>) e  $x_4$  (50 °C). B: Variáveis:  $x_1$  (tempo) e  $x_3$  (solvente/amostra) e constante  $x_2$  (55%) e  $x_4$  (50 °C). C: Variáveis:  $x_1$  (tempo) e  $x_4$  (temperatura) e constante  $x_3$  (25 mL g<sup>-1</sup>) e  $x_2$  (55%). **D:** Variáveis:  $x_2$  (amplitude) e  $x_3$  (solvente/amostra) e constante  $x_1$  (15 min) e  $x_4$  (50 °C). **E:** Variáveis:  $x_2$  (amplitude) e  $x_4$  (temperatura) e constante  $x_3$  (25 mL g<sup>-1</sup>) e  $x_1$  (15 min). **F:**  $x_3$  (solvente/amostra) e  $x_4$  (temperatura) e constante  $x_1$  (15 min) e  $x_2$  (55%). ..... 56

**Figura 5.5.** Superfície de Resposta para FRAP. A: Variáveis:  $x_1$  (tempo) e  $x_2$  (amplitude) e constante  $x_3$  (25 mL g<sup>-1</sup>) e  $x_4$  (50 °C). B: Variáveis:  $x_1$  (tempo) e  $x_3$  (solvente/amostra) e constante  $x_2$  (55%) e  $x_4$  (50 °C). C: Variáveis:  $x_1$  (tempo) e  $x_4$  (temperatura) e constante  $x_3$  (25 mL g<sup>-1</sup>) e  $x_2$  (55%). **D:** Variáveis:  $x_2$  (amplitude) e  $x_3$  (solvente/amostra) e constante  $x_1$  (15 min) e  $x_4$  (50 °C). **E:** Variáveis:  $x_2$  (amplitude) e  $x_4$  (temperatura) e constante  $x_3$  (25 mL g<sup>-1</sup>) e  $x_1$  (15 min). **F:**  $x_3$  (solvente/amostra) e  $x_4$  (temperatura) e constante  $x_1$  (15 min) e  $x_2$  (55%). ..... 57

**Figura 5.6.** Curva cinética experimental dos extratos das folhas de cravo obtidos pela extração supercrítica com CO<sub>2</sub>: ■ (200 bar, 40 °C); ✱ (200 bar, 60 °C); ▲ (250 bar, 50 °C); ▼ (300 bar, 40 °C); ● (300 bar, 60 °C)..... 67

**Figura 5.7.** Comparação entre a atividade antioxidante (DPPH e FRAP), Teor de compostos fenólicos (TCF) e rendimento total e de eugenol dos extratos das folhas de cravo da Índia obtidos por CO<sub>2</sub> supercrítico (SFE) (300 bar, 60 °C, 80 min), líquido pressurizado (PLE) com etanol (60 °C, 20 min) e assistida por ultrassom (UAE) (20 min, 70 %, 30 mL g<sup>-1</sup>, 60 °C). ..... 71



## LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência ( <i>High-performance liquid chromatography</i> )
DPPH	Radical 2,2 –diphenil1-picrilhidrazil ( $\mu\text{mol Trolox mg}^{-1}$ )
TCF	Teor de compostos fenólicos ( $\mu\text{g EAG mg}^{-1}$ )
FRAP	Potencial Antioxidante redutor de ferro ( $\mu\text{mol}_{\text{Fe}^{2+}} \text{mg}^{-1}$ )
EAG	Equivalente em ácido gálico
OE	Óleo essencial
T	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )
P	Pressão (bar)
ME	Método convencional de maceração
SFE	Extração com fluído supercrítico ( <i>Supercritical fluid extraction</i> )
PLE	Extração com líquido pressurizado ( <i>Pressurized liquid extraction</i> )
UAE	Extração assistida por ultrassom ( <i>Ultrasound-assisted extraction</i> )

**COMPOSTOS ANTIOXIDANTES E QUANTIFICAÇÃO DO EUGENOL DE  
EXTRATOS DAS FOLHAS DE CRAVO DA ÍNDIA (*Syzygium aromaticum*)  
OBTIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO**

**DOUTORANDA: PAULA CASSIANA FROHLICH**

**ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON ANTÔNIO DA SILVA**

Tese de Doutorado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química – nível Doutorado; Universidade Estadual do Oeste do Paraná; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85903-000- Toledo – PR, Brasil, defendida em 25 de maio de 2023. 101p.

**RESUMO**

O cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) é uma árvore aromática da família Myrtaceae de grande interesse industrial devido à sua composição de eugenol (fenilpropanóide), o qual é empregado na área farmacêutica, cosmética, alimentícia e agricultura. O método mais utilizado pelas indústrias para obter o óleo a partir dos botões de florais secos e das folhas do cravo da Índia é pela destilação por arraste a vapor. No entanto, este método de extração possui algumas desvantagens, tais como, longo tempo de extração e altas temperaturas no processo, podendo degradar alguns dos compostos ativos. Desta forma, é importante buscar alternativas para obtenção do extrato de cravo da Índia com elevados rendimentos, tempos de extração reduzidos e um extrato de alta qualidade, ricos em concentração de compostos bioativos. Dentro deste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os extratos das folhas de cravo da Índia em termos de rendimento, composição química, teor de fenólicos e atividade antioxidante, obtidos por diversos métodos de extração: Soxhlet, assistida por ultrassom, maceração, líquido pressurizado e supercrítica com dióxido de carbono. As extrações com Soxhlet, com duração de 8 h, foram realizadas com os solventes *n*-hexano, acetato de etila e etanol. Os extratos obtidos com etanol apresentam os melhores resultados em relação ao rendimento de extração (26,25%). As folhas de cravo foram submetidas à extração assistida por ultrassom (UAE) com solvente etanol, seguindo um planejamento composto central para avaliar os efeitos do

tempo (5 min – 25 min), amplitude (25% - 85%), razão solvente/amostra (15 mL g<sup>-1</sup> - 35 mL g<sup>-1</sup>) e temperatura (30 °C – 70 °C) no rendimento de extrato, rendimento de eugenol e a capacidade antioxidante dos mesmos. Os resultados foram comparados ao obtido do método convencional de maceração (ME). A condição ótima para o rendimento de extrato foi alcançada com tempo de extração de 25 min, amplitude de 85%, razão solvente/amostra 35 mL g<sup>-1</sup> e temperatura de 70 °C e o resultado (14,63%) foi 3 vezes maior que o da extração convencional. A análise dos extratos obtidos de ambos os métodos revelou a presença de eugenol na composição, com o maior rendimento de 2,71 g eugenol por kg folhas pelo método UAE (20 min, 70%, 20 mL g<sup>-1</sup>, 40 °C), enquanto o método ME foi de 1,30 g eugenol por kg folhas. Nas extrações com líquido pressurizado (40, 50 e 60 °C; 100 bar e 20 min) utilizou-se o solvente etanol. Neste processo de extração, à 60 °C foi obtido o maior rendimento de extrato (6,54%) e, um rendimento de eugenol de 2,66 g eugenol por kg folhas. As extrações com CO<sub>2</sub> supercrítico (SFE) foram realizadas nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C e pressões de 200, 250 e 300 bar, com vazão volumétrica de 3 mL min<sup>-1</sup> e tempo total de extração de 80 minutos. O maior rendimento obtido foi de 1,94% em 60 °C e 220 bar. Nesta condição o rendimento de eugenol foi de 8,06 ± 0,025 g eugenol por kg folhas, o teor de compostos fenólicos foi de 316,74 ± 0,29 µg GAE mg<sup>-1</sup> e a capacidade antioxidante foi de 3,02 ± 0,05 µmol Trolox mg<sup>-1</sup> e 17,79 ± 0,24 µmol Fe<sup>2+</sup> mg<sup>-1</sup>, resultados que foram considerados ótimos dentre os métodos não convencionais avaliados. Os extratos obtidos pela SFE, apresentaram menores rendimentos de extrato, no entanto, maior concentração do composto de interesse, eugenol, além de elevada capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos. Já os demais métodos (UAE e PLE) avaliados, embora apresentarem menor concentração de eugenol, tiveram maiores rendimento de extratos, bem como, capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos satisfatórios.

**PALAVRAS-CHAVE:** Óleo de cravo, extração supercrítica, extração com líquido pressurizado, extração assistida por ultrassom.

# **ANTIOXIDANT COMPOUNDS AND EUGENOL QUANTIFICATION OF EXTRACTS FROM CLOVE (*Syzygium aromaticum*) LEAVES OBTAINED BY DIFFERENT EXTRACTION METHODS**

**AUTHOR: PAULA CASSIANA FROHLICH**

**SUPERVISOR: PROF. DR. EDSON ANTÔNIO DA SILVA**

Doctoral thesis; Chemical Engineering Graduate Program – Doctorate level; Western Paraná State University; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85903-000 - Toledo - PR, Brazil, presented on May 25th 2023. 101p.

## **ABSTRACT**

Clove (*Syzygium aromaticum*) is an aromatic tree of the family Myrtaceae of great industrial interest due to its eugenol (phenylpropanoid) composition, employed in the pharmaceutical, cosmetics, food, and agriculture areas. The method most used by industries to obtain oil from dried flower buds and clove leaves is steam distillation. However, this extraction method has some disadvantages, such as long extraction time and high temperatures in the process, which may cause degrade some of the active compounds. Thus, searching for alternatives to extract cloves with high yields, shortened extraction times, and a good quality extract is important. In this context, the present study aimed to evaluate extracts from clove leaves regarding yield, chemical composition, phenolic compounds, and antioxidant activity, obtained by several extraction methods: Soxhlet, ultrasound-assisted, supercritical carbon dioxide under high pressures, and pressurized-liquid extraction. Soxhlet extractions (8 hours) were performed with the solvents n-hexane, ethyl acetate, and ethanol. The extracts obtained with ethanol presented the best results concerning extraction yield (26.25%). Clove leaves were then subjected to ultrasound-assisted extraction (UAE) with the solvent ethanol, following a central composite experimental design to evaluate the effects of time (5 min – 25 min), amplitude (25% - 85%), solvent/sample ratio (15 mL g<sup>-1</sup> - 35 mL g<sup>-1</sup>), and temperature (30 °C – 70 °C) in the extract yield, eugenol yield, and their antioxidant activity. The results were compared to the ones obtained with the conventional method of maceration (ME). The optimum condition for extract yield

was reached with an extraction time of 25 min, an amplitude of 85%, a solvent/sample ratio of 35 mL g<sup>-1</sup>, and a temperature of 70 °C, and the result (14.63%) was three times higher than conventional extraction. The analysis of the extracts obtained for both methods revealed the presence of eugenol in the composition, with the highest yield of 2.71 g eugenol per kg leaves using the UAE method (20 min, 70%, 20 mL g<sup>-1</sup>, 40 °C), while the ME method provided 1.30 g eugenol per kg leaves. In the pressurized-liquid extractions (40, 50, and 60 °C; 100 bar and 20 min), ethanol was the solvent. In this extraction process, at 60 °C the highest extract yield (6.54 %) was obtained, and an eugenol yield of 2.66 g eugenol per kg leaves. The supercritical CO<sub>2</sub> extractions (SFE) were performed in temperatures 40, 50, and 60 °C and pressures 200, 250, and 300 bar, with a volumetric flow rate of 3 mL min<sup>-1</sup>, and a total extraction time of 80 min. The highest yield obtained was 1.94 % at 60 °C and 220 bar. In this condition, the eugenol yield was 8.06 ± 0.025 g eugenol per kg leaves, the content phenolic compounds was 316.74 ± 0.29 µg GAE mg<sup>-1</sup> and the antioxidant capacity was 3.02 ± 0, 05 µmol Trolox mg<sup>-1</sup> and 17.79 ± 0.24 µmol Fe<sup>2+</sup>mg<sup>-1</sup>, results that were considered optimal among the non-conventional methods evaluated. The extracts obtained by SFE showed the best extract yields, however, higher concentration of the compound of interest, eugenol, in addition to high antioxidant capacity and content of phenolic compounds. The other methods (UAE and PLE) evaluated, despite having a lower concentration of eugenol, showed a higher yield of extracts, as well as satisfactory antioxidant capacity and content of phenolic compounds.

**Keywords:** *Clove Oil*, supercritical extraction, pressurized-liquid extraction, ultrasound-assisted extraction.

## 1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais (OE), presentes nos vegetais apresentam composições complexas de substâncias voláteis lipofílicas, responsáveis pelo odor e fragrância característicos das plantas (NERIO; OLIVERO-VERBEL; STASHENKO, 2010). Os OE exercem várias funções para as plantas, dentre elas: agem como inibidores de germinação, contra o aumento de temperatura e como regulador da perda de água, além de apresentar diversas atividades farmacológicas, tais como antioxidante, antibacteriana e antifúngicas (BAKKALI *et al.*, 2008; PAVELA, 2015). OEs são amplamente encontrados no reino vegetal principalmente nas famílias Apiaceae, Asteraceae, Lauraceae, Laminaceae e Myrtaceae (REGNAULT-ROGER; VINCENT; ARNASON, 2012).

O cravo (*Syzygium aromaticum*) é uma árvore aromática da família Myrtaceae, de grande interesse industrial devido ao seu composto majoritário, eugenol (fenilpropanóide), presente em sua composição química, que encontra grande número de aplicações na área farmacêutica, cosmética, alimentícias e agricultura (BAGETTA *et al.*, 2010; CORTES-ROJAS; DE SOUZA; OLIVEIRA, 2014). O óleo essencial do cravo extraído dos botões e das folhas tem importantes propriedades medicinais como alto poder antibacteriano (CUI *et al.*, 2008), atividade antifúngica (RANA; KASHMIRI; AHMAD, 2010), antioxidante (SHAN *et al.*, 2005), e antiviral (CHAIEB *et al.*, 2007). Além de ser um analgésico natural muito utilizado na odontologia (SINGH; CHANDEL; MONOHAR, 2018)

Dentre as técnicas usuais de extração de compostos bioativos de plantas aromáticas, estão a extração por hidrodestilação, Soxhlet e maceração. Os métodos alternativos de obtenção destes compostos incluem a extração assistida por micro-ondas, extração com fluidos supercríticos, com líquido pressurizado (PLE) e assistida por ultrassom (ERKAN; AYRANCI; AYRANCI, 2008; TEKIN; AKALIN; ŞEKER, 2015). A técnica de hidrodestilação é um dos métodos mais comuns para a extração de OEs e consiste, basicamente, na evaporação do líquido volátil pela imersão da matéria-prima em água fervente seguida de sua condensação (RASSEM; NOUR, 2016). Vários autores empregaram esta técnica na obtenção do OE das folhas de cravo, avaliando tanto rendimento quanto a composição química (RAINA *et al.*, 2001; SRIVASTAVA; SRIVASTAVA; SYAMSUNDAR, 2005; BHUIYAN *et al.*, 2010;

BHUIYAN, 2012; REYES-JURADO *et al.*, 2015; GAYLOR *et al.*, 2016; PUJIARTI *et al.*, 2020). Em estudo anterior (FROHLICH *et al.*, 2019), a extração convencional Soxhlet com o solvente hexano foi empregada a fim de comparação de rendimento, composição e atividade antioxidante com os extratos obtidos das folhas de cravo pela extração não convencional com CO<sub>2</sub> supercrítico. No entanto, os métodos convencionais de hidrodestilação e extração Soxhlet apresentam algumas desvantagens, tais como, elevado tempo de extração, grandes quantidades de solventes, consumo elevado de energia. Além disso, muitos compostos são termicamente instáveis e podem ser degradados durante o processo de extração (KIMBARIS *et al.*, 2006; XIE *et al.*, 2015; WEI; XIAO; YANG, 2016).

A maceração é um processo tradicional de extração de materiais vegetais, o qual o material vegetal fica em contato com o líquido extrator em um recipiente fechado, em temperatura determinada, durante um período de tempo, sob agitação dinâmica ou estática, sem renovação do líquido extrator. Ao final do processo o líquido extrator é separado e o extrato coletado. Além disso, essa técnica é conveniente para extração de termolábeis (CACIQUE *et al.*, 2020). A eficiência da extração de compostos bioativos de plantas quando utilizada a técnica com solvente orgânico pode ser potencializada com aplicação de ultrassom (UAE). O ultrassom ajuda a acelerar o processo de extração e reduzir o consumo de energia. Além disso, ao contrário de métodos convencionais, esse método de extração permite a aplicação de baixas temperaturas, possibilitando a preservação de compostos sensíveis ao calor (ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011; ALEXANDRU *et al.*, 2013; CHEMAT; TEKIN; AKALIN; ŞEKER, 2015; VINATORU; MASON; CALINESCU, 2017).

A extração por PLE é uma técnica bastante empregada em extrações de compostos bioativos presentes em materiais vegetais (HIRONDART *et al.*, 2020). É um método de extração que combina temperatura e pressão com solventes líquidos para alcançar rápida e eficiente extração de compostos de interesse. Além disso, considera-se um método promissor, uma vez que apresenta maior seletividade, permite baixos volumes de solventes e rapidez no processo de extração (DEBIEN *et al.* 2015). Diante disso, a extração PLE vem sendo cada vez mais aplicada para extração de materiais industriais com diversas aplicações, como: compostos fenólicos de recursos florais

(KRAUJALIENE *et al.* 2017), chá verde (BERMEJO *et al.* 2015) e outros produtos naturais (DIAS *et al.* 2021).

O etanol é um solvente promissor para ser empregado em extrações de plantas medicinais para obtenção de compostos bioativos tanto pelos métodos convencionais como os alternativos mencionados acima. A utilização do etanol como solvente apresenta inúmeras vantagens, tais como: segurança operacional, potencial de reduzir os impactos ambientais, como a emissão de gases de efeito estufa, alta pureza e biodegradabilidade. O etanol é um produto renovável obtido a partir de processos biotecnológicos e classificado como solvente verde (NAVARRO *et al.*, 2016; NAVARRO *et al.*, 2016; CAPELLINI *et al.*, 2017; SAMPAIO NETO; BATISTA; MEIRELLES, 2018; STEVANATO; DA SILVA, 2019).

A extração supercrítica, em altas pressões usando CO<sub>2</sub>, é outro método não convencional promissor na extração de compostos bioativos de plantas, sendo considerado um processo verde. O CO<sub>2</sub> é reconhecido como seguro para a saúde humana e para o meio ambiente, não tóxico, não inflamável e estando no estado gasoso à temperatura e pressão ambiente, é removido do extrato após a descompressão do sistema. Assim, permite obter produtos com alta qualidade, sem que os mesmos percam ou sofram alterações em suas propriedades (KHAW *et al.*, 2017). O fracionamento com fluidos supercríticos (SFE) pode ser obtido por meio da manipulação das condições operacionais (temperatura e pressão), obtendo produtos com alto grau de pureza.

Oliveira *et al.* (2016) e Frohlich *et al.* (2019) usaram essa tecnologia de extração para avaliar a composição química e capacidade antioxidante do botão comercial e das folhas de cravo da Índia, respectivamente. Nestes estudos, a faixa de pressão utilizada foi 150-220 bar, e os rendimentos encontrados foram de 0,74% a 1,08%, onde a variável pressão se mostrou como um fator positivo no processo. No entanto, não foram encontrados trabalhos na literatura, por SFE, que avaliassem pressões superiores aos usados por Frohlich *et al.* (2019) de 220 bar. E ainda, há falta de estudos com emprego de métodos não convencionais como, por PLE e UAE para extrações deste material vegetal.

Dentro desse contexto, o presente estudo visa avaliar diferentes métodos de extração dos compostos bioativos das folhas de cravo da Índia, entre eles: extração assistida por ultrassom, extração com fluido supercrítico e por líquido



pressurizado para o rendimento de extrato. Além de investigar o conteúdo de eugenol e capacidade antioxidante dos extratos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O presente projeto de pesquisa visa investigar diferentes métodos de extração não convencionais do extrato das folhas de cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*): Solvente assistido por ultrassom, CO<sub>2</sub> supercrítico em altas pressões e líquido pressurizado com intuito de se obter um extrato rico em eugenol. Bem como, determinar a capacidade antioxidante dos extratos obtidos.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o rendimento de extração, com solventes de diferentes polaridades (etanol, acetato de etila e n-hexano) na extração das folhas de cravo (*Syzygium aromaticum*) pelo método Soxhlet;
- Avaliar os efeitos das variáveis: tempo, amplitude, razão solvente/massa de folha e temperatura na extração assistida por ultrassom;
- Otimizar as condições de extração das folhas assistida por ultrassom;
- Avaliar os efeitos da temperatura e pressão no rendimento de extrato obtido com CO<sub>2</sub> supercrítico na extração de folhas de cravo da Índia;
- Avaliar o efeito da temperatura na extração do extrato das folhas de cravo com solvente etanol pressurizado;
- Quantificar o composto eugenol presente nos extratos das folhas de cravo obtidos nas diferentes condições experimentais por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas;
- Avaliar a capacidade antioxidante dos extratos pelos métodos DPPH e FRAP, e quantificar o conteúdo de fenóis totais, por Folin-Ciocalteu, nos extratos obtidos pelos diferentes métodos;
- Comparar o desempenho das diferentes técnicas utilizadas em relação à composição de eugenol, rendimento, teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A seguir, apresenta-se informações a respeito do material vegetal utilizado no presente trabalho para obtenção dos extratos (Cravo da Índia - *Syzygium aromaticum*). Além disso, faz-se uma revisão sobre os métodos de extração empregados na obtenção de compostos bioativos e uma breve revisão sobre quantificação da atividade antioxidante.

#### 3.1 Cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*)

O Cravo (*Syzygium aromaticum*) é uma árvore pertencente à família Myrtaceae, considerada uma das especiarias mais antigas do Oriente. Esta espécie é nativa da Indonésia, podendo ser encontrada em diversos países, tais como, Brasil, Madagascar, México, Malásia, Índia e Haiti (ALMA *et al.*, 2007).

No Brasil, essa planta é cultivada na região do nordeste do país, notadamente no estado da Bahia, onde são cultivados cerca de 8000 hectares, com produção de cerca de 2500 toneladas anualmente (CORTES-ROJAS; DE SOUZA; OLIVEIRA, 2014; REIS *et al.*, 2006). Além disso, o Brasil vêm apresentando crescente avanço na produção de óleos essenciais, sendo destaque para destinação principalmente em indústrias farmacêutica, alimentícia e de cosmético (BAGETTA *et al.*, 2010).

O craveiro (Figura 3.1), apresenta copa alongada, podendo alcançar de 10 a 12 metros de altura, com folhas aromatzadas, ovais, lisas de aproximadamente 10 a 15 cm, e flores de cor avermelhadas com diversos cachos terminais agrupados no extremo dos galhos. O fruto possui formato alongado, com cheiro característico e forte. Seu amadurecimento é entre 8 e 10 anos após seu plantio. Além do mais, o ciclo vegetativo do cravo tende a chegar a mais de cem anos (ALMA *et al.*, 2007; CHAIEB *et al.*, 2007; ORWA *et al.*, 2009).



**Figura 3.1.** (A): Árvore de Cravo da Índia; (B): Folhas de cravo da Índia.  
**Fonte:** Autora (2022)

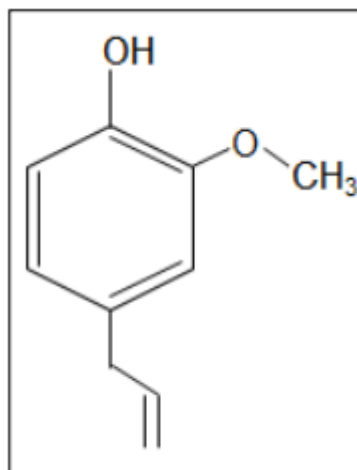
Dentre os compostos químicos presentes na composição nas folhas e botões de cravo da Índia, estão  $\beta$ - cariofileno (14% a 21%), 10 a 21% dos taninos, bem como fenóis e sesquiterpenos. O composto majoritário e mais importante componente dos extratos de cravo da Índia, é eugenol (40-98%), o qual é responsável pelo cheiro característico e marcante da planta (BHUIYAN, 2012; POLITEO; JUKIC; MILOS, 2010).

O uso tradicional do cravo da Índia, é apoiado, devido ao óleo deste, apresentar inúmeras propriedades farmacológicas, destacando propriedades antioxidantes, analgésico dentais (PINTO *et al.*, 2009), antibacteriano (HADIZADEH; PEIVASTEGAN; HAMZEHZARGHANI, 2009), anti-inflamatório (SESSOU *et al.*, 2012) e atividade antifúngica (KAMATOU; VERMAAK; VILJOEN, 2012). No Brasil os principais produtos provenientes do cravo da Índia são o óleo essencial puro ou produtos derivados, cuja principal aplicação é como anestésico local utilizado na odontologia, e também o botão floral seco o qual é comercializado como tempero (AFFONSO *et al.*, 2012).

### 3.2 Eugenol

O eugenol ( $C_{10}H_{12}O_2$ ) (Figura 3.2), massa molar  $164,2 \text{ g. mol}^{-1}$  encontra-se distribuído no reino vegetal como constituinte de alguns óleos essenciais de plantas, sendo o composto majoritário do cravo da Índia. Esse composto, em

geral é líquido e apresenta uma coloração de incolor a amarelado, tem carácter volátil e baixa solubilidade em água. Além disso, dispõem de cheiro marcante do cravo e sabor ardente (BARROS GOMES *et al.*, 2018; CAI; WU, 1996; RAINA *et al.*, 2001).



**Figura 3.2.** Estrutura molecular do eugenol.  
**Autor:** Santos *et al.* (2009).

Diversas propriedades benéficas do eugenol já são conhecidas, como funções antioxidante, carminativa, antiespasmódica, antisséptica e anestésica. Diante disso, confere a este, um alto valor para indústrias de odontologia, alimentos, agropecuária, farmacêutica e cosméticos (MYINT *et al.*, 1996; PEREIRA *et al.*, 2008).

Em indústrias de alimentos, segundo *Food and Drug Administration* (FDA), é seguro quando utilizado em concentrações até 1500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O eugenol é mais utilizado como flavorizante, no entanto, possui aplicações como repelentes e em preparações farmacêuticas (RAINA *et al.*, 2001). O eugenol ainda, devido sua alta capacidade de atrair insetos também pode atuar como uma forma barata e segura no controle de pragas agrícolas, no lugar de defensivos químicos (SOFIA; SUZUKI, 2004).

O poder antioxidante presente em suas especiarias e em seus extratos é decorrente aos compostos fenólicos, o qual impede e/ou inibe a formação de radicais livres, removendo-os antes de causar algum dano as moléculas (PAVITHRA, 2014). Além de ter considerável poder antibacteriano, inibindo

dessa forma a multiplicação de *Staphylococcus sp*, *Bacillus sp*, *Enterobacter sp* por mais de 30 dias (NAIR *et al.*, 2005).

Dentre tantas aplicações, tem sido utilizado como ponto de partida para síntese de outros compostos fenólicos, como por exemplo, a vanilina, a qual é uma importante matéria prima na aromatização de chocolates, sorvetes e doces (DAUGSCH; PASTORE, 2005; PRIEFERT; RABENHORST; STEINBÜCHEL, 2001).

### **3.3 Métodos de extrações**

A extração pode ser definida como a retirada, de maneira seletiva e completa, das substâncias de interesse presentes nas plantas (VOROBIEV; LEBOVKA, 2016). A extração é o primeiro passo para se obter produtos naturais das matérias-primas vegetais. No entanto, há diversos fatores existentes que são capazes de influenciar no produto obtido de uma extração, como por exemplo: a natureza química das plantas, o solvente, método de extração utilizado, o tamanho de partículas de amostragem, fatores como agitação e temperatura durante o processo e o tempo de extração. Além de possíveis substâncias interferentes, que podem estar presentes na própria composição das plantas (STALIKAS, 2007).

Existem diversos métodos de extração em que os vegetais podem ser submetidos. O método a ser escolhido depende da parte da planta que o extrato de interesse se encontra, das características desejadas dos extratos, bem como da finalidade de uso o qual se deseja. Uma vez que, dependendo do método submetido à extração os produtos finais podem apresentar composição diferente e por consequência altera as características físico-químicas e as propriedades bioativas (POURMORTAZAVI; HAJIMIRSADEGHI, 2007; POVH *et al.*, 2001). Com isso, para minimizar alterações quantitativas nos extratos, e buscar a manutenção de características constantes, estes devem ser submetidos as mesmas condições de extração, e o material vegetal deve ser obtido do mesmo solo, clima e época.

O processo de extração consiste na transferência de um ou mais componentes de uma matriz - sólida ou líquida, para outra fase fluida por meio de processos químicos, físicos ou mecânicos (CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN,

2011) seguida pela separação da fase fluida e recuperação dos componentes (DANIELSKI *et al.*, 2008). Dentre os principais processos convencionais de extração existem, por Soxhlet, maceração e hidrodestilação. Já os métodos não convencionais existentes são: extração assistida por ultrassom, fluido supercrítico e extração por líquido pressurizado (ANDREU; PICÓ, 2019; AZMIR *et al.*, 2013; WANG; WELLER, 2006).

Os métodos de extração convencionais, vem sendo amplamente empregados para extração de compostos bioativos de diversas plantas e são considerados modelos de referência para comparar com novas técnicas de extração alternativas (LUQUE DE CASTRO; GARCÍA-AYUSO, 1998; LUQUE DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010; WANG; WELLER, 2006).

A extração por solvente é muito utilizada em indústrias para isolar compostos bioativos de materiais vegetais (ANDREU; JORGE, 2006). Para tanto, a eficácia da extração por qualquer método empregado depende do tipo de solvente utilizado. Sendo, o caráter polar do composto de interesse, o fator mais importante na escolha do solvente. Além disso, a afinidade molecular entre o solvente e o soluto, a transferência de massa, o uso de cossolventes, toxicidade e competitividade econômica também devem ser levados em consideração na escolha do solvente (AZMIR *et al.*, 2013).

O método de extração por hidrodestilação é um dos mais utilizados para extrações de óleo essencial de plantas aromáticas. Esse processo consiste basicamente na evaporação e em seguida a condensação de um líquido. A amostra fica em contato direto com a água, durante todo o processo de ebulição, em seguida, após o óleo ser difundido é vaporizado e carregado pela corrente de vapor. A vantagem desse processo é o considerável rendimento final do produto e também elevado grau de pureza (BASER; BUCHBAUER, 2010).

A técnica com aparato Soxhlet, permite a realização com uma pequena quantidade de amostra, onde esta é envolvida por um cartucho poroso e colocado no interior do extrator. No balão de fundo redondo, o solvente entra em ebulição e quando condensa entra em contato com a matriz do vegetal. Essa solução (solvente + extrato) então transborda, sendo aspirada por um sifão que devolve a solução para o frasco de destilação. Assim, o extrato permanece no balão de destilação enquanto o solvente retorna para o leito de extração. Esse processo é repetido até que a extração seja interrompida (AZMIR *et al.*, 2013;

LUQUE DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010). Em sequência, o solvente é evaporado para se obter o extrato desejado. Tendo em vista que, a escolha adequada do solvente é de suma importância para se obter bom rendimento de extração (QUEIROZ; COLLINS, 2001).

A vantagem de utilizar essa técnica de extração, é que este, permite um equilíbrio da transferência, pois o solvente passa em contato com a amostra várias vezes e não precisa de uma etapa de filtração entre a matéria-prima e o solvente no fim da extração, pois, a amostra permanece no cartucho durante toda a extração. Ainda, o aparato é de baixo custo, sendo possível a realização de várias extrações ao mesmo tempo (BASER; BUCHBAUER, 2010).

A maceração é uma técnica de extração, que consiste em imergir o material vegetal no solvente dentro de um recipiente, por um determinado tempo e temperatura determinada. Outro efeito utilizado nesse processo é a agitação, em que pode ser de forma dinâmica ou estática sem renovação do solvente extrator. Ao término da extração, é feita a evaporação do líquido extrator e o extrato coletado (CACIQUE *et al.*, 2020). O solvente deve ser escolhido com base na composição química contida na planta, e composto bioativo de interesse (MINOZZO *et al.*, 2012; NN, 2015). No entanto, esse método pode apresentar algumas desvantagens, tais como: maior quantidade de amostra, baixo rendimento, longos períodos de extração, grande volume de solvente e requer etapa de purificação após extração para remoção do solvente (JOVANOVIĆ *et al.*, 2017; MAZZUTTI *et al.*, 2017).

Todavia, os métodos convencionais, apresentam algumas desvantagens como: a necessidade da remoção do solvente, além de que os resíduos de solvente podem provocar alterações químicas nas moléculas provocando alterações nas características dos extratos obtidos. Ainda, permite a presença de solventes tóxicos nos mesmos. Além disso, os métodos convencionais de extração requerem maior tempo de extração, fato este, que consome elevada energia e pode acarretar na decomposição térmica de compostos termolábeis, e baixa seletividade dos compostos de interesse (AZMIR *et al.*, 2013; LUQUE DE CASTRO; GARCÍA-AYUSO, 1998).

Tendo em vista as limitações apresentadas pelos métodos convencionais de extração, há necessidade de desenvolvimento e aplicações de novos processos de extração. Dentre esses, a extração supercrítica, extração assistida



por ultrassom e, com líquido pressurizado são alternativas promissora para obtenção de compostos bioativos (STEFFANI *et al.*, 2006).

### **3.3.1 Extração assistida por ultrassom (UAE)**

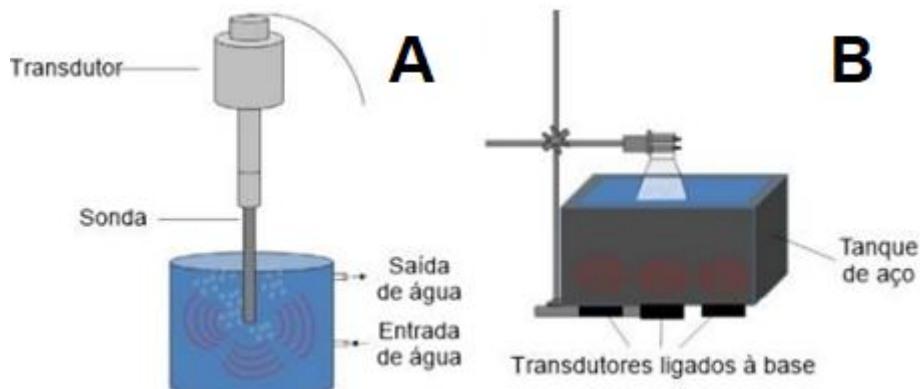
A técnica de extração assistida por ultrassom, é uma tecnologia promissora que vem sendo cada vez mais empregada em estudos (ALONSO-CARRILLO *et al.*, 2017; MITTAL *et al.*, 2017; PERRIER *et al.*, 2017). Através do ultrassom, extrações podem ser realizadas em menor tempo com maior rendimento de extração. Além disto, o consumo de solvente pode ser reduzido, sendo que essa técnica possibilita o consumo de apenas uma fração da energia quando comparada com a energia gasta para um método de extração convencional, tal como a extração por Soxhlet ou maceração. Além de permitirem condições ideais para extração de compostos termolábeis (ALBUQUERQUE *et al.*, 2017; CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011; CHEN *et al.*, 2014).

As ondas sonoras ultrassônicas precisam de um meio (gás, líquido ou sólido) com propriedades elásticas afim de se propagarem. A técnica por UAE se dá pela força motriz dada pela cavitação, processo este que ocorre quando uma onda ultrassônica se propaga em um meio líquido. Durante a propagação, uma série de compressões e expansões ocorrem nas moléculas do meio e essas mudanças de pressão provocam a produção e colapso de uma série de microbolhas. O processo em que as bolhas se formam, crescem e sofrem implosões, é chamado de cavitação. Efeito este, responsável pelos efeitos ultrassônicos (ZHAO; ZHANG, 2013). Durante o colapso das bolhas, pode-se verificar a nível microscópico valores de aproximadamente 5000 K de temperatura e 50 MPa de pressão. Essas alterações nas membranas celulares e perturbação das células, resultam numa penetração aprimorada do solvente nas células e incremento da transferência de massa dos solutos para o solvente (ALBUQUERQUE *et al.*, 2017; TIWARI, 2015).

As implosões geradas, em meio a turbulências, geram colisões entre partículas e agitação nos microporos da matriz, permitindo assim, o aceleração da difusão. Outro efeito importante relevante nessa técnica - com abertura dos poros-, é a hidratação e inchaço da matriz, ocorrendo o

alargamento dos poros, o que aumenta a difusão do solvente para a matriz. Esses impactos, se mostram mais vantajosos, quando empregado matriz seca, em que, possui poros de menor dimensão, em comparação com matrizes úmidas (TIWARI, 2015).

Os processos de extração por ultrassom, podem ser realizados em diferentes tipos de equipamentos de ultrassom, sendo eles, o ultrassom de banho e o de sonda ultrassônica (Figura 3.3). O ultrassom de banho consiste em um tanque de aço inox com um ou mais transdutores ultrassônicos. Esse tipo de ultrassom, geralmente opera a uma frequência de cerca de 40 kHz e pode ser equipado com controladores de temperatura (CHEMAT *et al.*, 2017). O banho ultrassônico é o método mais comumente utilizado, devido ao seu baixo custo, maior disponibilidade de modelos e ao grande número de amostras que podem ser tratadas simultaneamente. No entanto, apresenta algumas limitações, tais como: baixa reprodutibilidade, devido a perda da intensidade com o passar do tempo, e a baixa potência fornecida diretamente à amostra, em relação com os sistemas de sonda (BOEIRA *et al.*, 2018; CHEMAT *et al.*, 2017).



**Figura 3.3.** (A) Banho ultrassônico com sonda. (B) Ultrassom de banho.

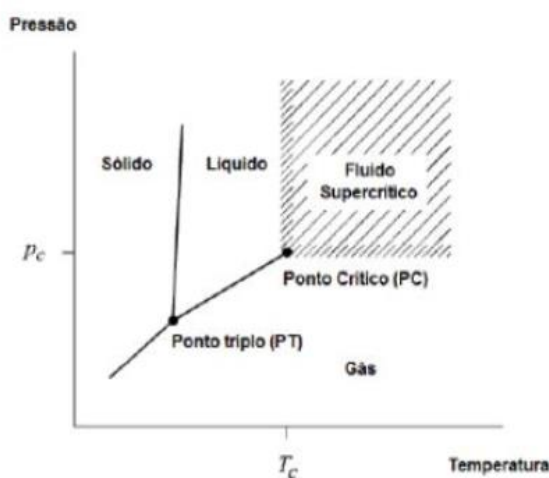
**Fonte:** Chemat *et al.* (2017)

O equipamento de ultrassom com sonda, é mais potente devido a uma intensidade ultrassônica fornecida através de uma superfície menor (apenas a ponta da sonda), quando comparado com o banho ultrassônico (LUQUE DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010). A frequência que os sistemas operam é cerca de 20 kHz a 10 MHz, sendo imperceptível pelos seres humanos. Além disso, nesse tipo de ultrassom, podem ser aplicados diferentes tipos de sonda,

com variação no diâmetro, tamanho e formas geométricas, em que são selecionadas, dependendo do volume e aplicação de amostra a ser utilizada no processo, fator esse que podem acabar influenciado na eficácia da extração (CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011).

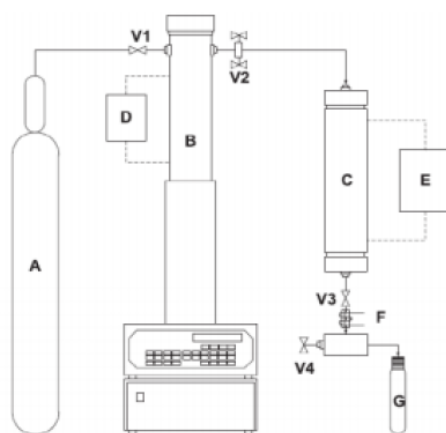
### 3.3.2 Extração com fluido supercrítico

Um fluido supercrítico é uma substância que apresenta as propriedades de pressão, temperatura e volume acima dos seus valores críticos. Ao atingir o ponto crítico as fases gasosa e líquida se tornam indistinguíveis, sendo então referenciada como “fase supercrítica” (Figura 3.4). Abaixo desse ponto crítico, a substância pode se encontrar no estado sólido, líquido ou vapor (BRUNNER, 2005; KREGER; CRAVEN; MCCABE, 1980). Dessa forma, considera-se a temperatura crítica como aquela mais alta em que o gás pode ser convertido em líquido com o aumento da pressão. Já a pressão crítica é a pressão mais alta a qual o líquido pode ser convertido em gás pelo aumento da temperatura (HERRERO; CIFUENTES; IBAÑEZ, 2006; QUEIROZ; COLLINS, 2001). Quando o fluido se encontra em um estado próximo da região supercrítica, este apresenta características semelhantes às do fluido supercrítico. Sendo assim, pode ser chamado de fluido supercrítico.



**Figura 3.4.** Diagrama de fases típico para um composto puro. (Adaptado de: (Herrero; Cifuentes; Ibañez, 2006))

Essa técnica de extração utiliza-se de um aparato experimental tradicional exclusivo para extrações supercríticas (Figura 3.5). Esse método, consiste pelo contato existente entre o fluido em estado supercrítico e o líquido ou o sólido em condições de temperatura e pressão determinadas. O solvente é fornecido através de cilindros, a pressão de operação é obtida por uma bomba e a temperatura por um trocador de calor. Os compostos presentes na amostra são solubilizados pelo solvente ainda no extrator. Em seguida, a mistura solvente-soluto é submetida a uma decompressão por uma válvula de pressão. Assim, em ambos os casos a mistura passa a ser um gás-soluto e o soluto é então recolhido no coletor (FROHLICH et al., 2019; PEREIRA; MEIRELES, 2010).



**Figura 3.5.** Módulo de extração supercrítico: A: Cilindro de gás. B: Bomba seringa; C: Extrator. D e E: Banhos termostático. F: Controlador de temperatura na válvula micrométrica. G: Coletor de extrato. V1, V2, V3 e V4 válvulas agulha. **Fonte:** (DA SILVA et al., 2014).

Dessa forma, o fluido passa a ter propriedades físico-químicas intermediárias entre as de um gás e de um líquido, expandindo sua função como solvente. A densidade relativamente alta, próximo a de líquidos, lhe proporciona um grande poder de solvatação. Já a tensão superficial e viscosidade baixas junto com sua alta difusividade, carácter dos gases, proporciona um considerável poder de penetração na matriz do soluto (BRUNNER, 2005; HERRERO; CIFUENTES; IBAÑEZ, 2006).

Devido à forte dependência da solubilidade em virtude da pressão e temperatura, esses fatores tornam-se muito explorado nas extrações supercríticas. Uma vez que, pequenas alterações nessas propriedades podem

acarretar grandes variações nas propriedades físico-químicas do solvente, e com isso são diretamente relacionadas com a composição química dos extratos. Assim, a escolha nos valores de pressão e temperatura, dependem da solubilidade do soluto em que deseja-se, no solvente supercrítico (PEREIRA; MEIRELES, 2010). A vazão de escoamento do solvente e geometria do leito também podem influenciar nesse processo de extração. Com isso, é possível obter condições favoráveis na extração de solutos com alto grau de recuperação, em pequeno período tempo (POURMORTAZAVI; HAJIMIRSADEGHI, 2007).

O emprego da extração supercrítica, permite a extração de compostos de complexa mistura, sendo este o composto de interesse, especialmente composto com baixa volatilidade ou disposto a degradação térmica, ou ainda, permite a extração de componente indesejável que deseja ser removido do produto final (AZMIR *et al.*, 2013; POURMORTAZAVI *et al.*, 2018). Além disso, apresenta muitas vantagens tais como: fácil recuperação do solvente após término do processo, não necessita de etapa posterior de purificação do extrato. Como também, permite a seletividade de compostos bioativos, uma vez que, modificando-se a temperatura e a pressão, conforme a necessidade de extração, altera-se as propriedades físico-químicas do solvente (PRONYK; MAZZA, 2009).

O solvente mais comumente utilizado para essa técnica é o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). O CO<sub>2</sub> é um solvente de baixo custo, disponível em alta pureza e permita manipulação segura (MIĆIĆ *et al.*, 2011). Além de que permite, a extração seletiva de compostos bioativos solúveis de materiais vegetais (GARCIA-MENDOZA *et al.*, 2017). Possuem características positivas como, não tóxico, não inflamável, inodoro, inerte e não oferece risco de reações secundárias, como oxidações e hidrólises (CHEAH; HENG; CHAN, 2010; CRUZ *et al.*, 2017; DÍAZ-REINOSO *et al.*, 2006). No entanto, devido seu caráter apolar, esse solvente é ideal apenas para extração de compostos apolares ou baixa polaridade. Quando há necessidade de extração de compostos polares, é necessário a utilização conjunta de um modificador (GARCIA-MENDOZA *et al.*, 2017).

A extração supercrítica com CO<sub>2</sub> por ser uma tecnologia limpa, livre de contaminação por solvente, é muito utilizada em indústrias alimentícias e farmacêuticas (POURMORTAZAVI; HAJIMIRSADEGHI, 2007). Os extratos obtidos por estes métodos, tem sido amplamente estudado, pois, são grandes

fontes de compostos bioativos. Além disso, essa técnica permite, extratos com maior qualidade, maior concentração dos compostos, e/ou maior atividade biológica em comparação com extratos obtidos pelos métodos convencionais (FORNARI *et al.*, 2012).

Todavia, a extração com fluidos supercríticos apresenta algumas desvantagens: elevado investimento, devido ao alto custo dos equipamentos e a periculosidade, visto que os equipamentos permitem processos em altas pressões (ANDREO; JORGE, 2006; MENDES *et al.*, 2003). Ainda, apresenta dificuldade em extrair compostos polares sem a adição de um co-solvente adequado (WANG; WELLER, 2006).

### **3.3.3 Extração com líquido pressurizado**

O processo de extração com líquido pressurizado (PLE, em inglês: *pressurized liquid extraction*), também conhecida como extração acelerada por solvente, foi descrito pela primeira vez em 1995 (CARABIAS – MARTINEZ *et al.*, 2005). É amplamente empregado para extração de compostos bioativos presentes em matriz vegetais (HIRONDART *et al.*, 2020).

A extração com líquido pressurizado é uma técnica que consiste no uso de solventes líquidos a temperatura (40-200 °C) e pressões (3,5 – 20MPa) elevadas, a fim de manter o solvente no estado líquido e permitindo o melhor desenvolvimento da extração quando comparado com métodos realizados em temperatura ambiente e pressão atmosférica (GARCIA-MENDOZA *et al.*, 2017; VAZQUEZ-ROIG PICÓ, 2015).

A PLE, vem sendo amplamente utilizada como uma técnica alternativa para extração e fracionamento de produtos naturais, uma vez que permite uma redução no tempo e no volume de solvente utilizado no processo, em comparação com as demais técnicas de extração (CARABIAS-MARTINEZ *et al.*, 2005; ZAIBUNNISA *et al.*, 2009). Ademais, esse processo de extração, permite que os parâmetros sejam ajustáveis para melhor seletividade de compostos de interesse. Os principais solventes utilizados para essa técnica são água e etanol, assim é considerada uma tecnologia segura para operação (MACHADO; PARISE; CARVALHO, 2014)

O desempenho das extrações por esse método, dependem do tipo de solvente, tempo de extração, número de ciclos de extração, temperatura, a natureza do material vegetal - características específicas dos compostos de interesse e sua localização dentro da matriz e em menor influência, a pressão (MUSTAFA; TURNER, 2011). Quando empregado em temperaturas elevadas, essa reduz a viscosidade e tensão superficial do solvente, permitindo melhor solubilização dos compostos. Além disso, facilita a quebra das interações entre composto-matriz, aumentando os coeficientes de difusão e por conseguinte, a eficiência do processo de extração (MENDIOLA *et al.*, 2007). No entanto, a conservação dos compostos alvos, podem ser afetados pela combinação de altas pressões e temperaturas. Assim sendo, é importante selecionar cuidadosamente a temperatura de extração para não haver degradação dos compostos bioativos, ou ainda, extração de compostos indesejáveis (WANG; WELLER, 2006).

A PLE pode ser realizado no modo estático, no modo dinâmico ou pela combinação desses (VAZQUEZ-ROIG & PICÓ, 2015). Na configuração dinâmica, o solvente de extração é bombeado continuamente pelo extrator contendo o material, fornecendo uma vazão de solvente constante enquanto a válvula de saída da célula de extração é mantida aberta. Já no modo estático, o processo de extração consiste em um ou vários ciclos de extração, onde o solvente é adicionado novamente a cada ciclo. A válvula de saída da célula de extração é mantida fechada, permanecendo em contato com a matriz durante um tempo determinado (SAITO *et al.*, 2004). Após, o tempo de extração, a válvula de saída é aberta, liberando a mistura de solvente e extrato a ser coletado (OSORIO-TOBÓN & MEIRELES, 2013).

Dentre as configurações, a extração dinâmica é mais eficiente que a estática, uma vez que esse modo, evita a saturação do solvente. Todavia, requer maiores volumes de solvente quando comparado com modo estático. No entanto, o modo estático permite maior penetração do solvente nos poros da matriz devido ao maior tempo de contato entre as fases (NIETO *et al.*, 2010).

Diante disso, a extração com líquido pressurizado é uma alternativa aos métodos de extração convencionais, como Soxhlet e maceração, uma vez que permite o uso de temperatura e pressão elevadas durante a extração, diminuindo o tempo e consumo de solventes, além de melhorar o rendimento de extração.

Além disso, essa técnica diminui os impactos ambientais em consideração as técnicas convencionais (SMITH, 2002).

### 3.4 Atividade antioxidante

A oxidação é um processo metabólico que leva à produção de energia necessária para as atividades essenciais das células. No entanto, o metabolismo do oxigênio nas células vivas também leva à produção de radicais livres, onde o excesso pode acarretar efeitos desfavorável, como por exemplo a peroxidação dos lipídeos das membranas. Diante disso, o excesso de radicais livres no organismo podem ser contido por antioxidantes, absorvidos ou até mesmo produzidos pelo próprio corpo, que por sua vez protegem o sistema biológico contra os efeitos prejudiciais de processos ou até mesmo reações que podem levar a oxidação excessiva (KRINSKY, 1998; MCCORD; WILSON, 1994).

Antioxidante pode ser definido como qualquer substância em que, quando presente em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, tem a capacidade de retardar ou ainda, prevenir consideravelmente a oxidação desse substrato (SIES; STAHL; SUNDQUIST, 1992). Substratos oxidável, são moléculas orgânicas encontrada *in vitro*, como as proteínas, carboidratos e DNA (HALLIWELL et al., 1995). Em indústrias há uma grande quantidade de compostos, os quais, são utilizados como antioxidantes, sendo estes, podendo ser de origem sintética ou natural.

O hidroxianisil butilato (BHA), hidroxitolueno butilato (BHT), di-*t*-butil-hidroquinona (TBHQ), dentre outros, são alguns antioxidantes sintéticos que podem ser utilizados. No entanto, o interesse por antioxidantes naturais, principalmente na utilização em alimentos teve um aumento significativo devido a possível efeito nocivo que os antioxidantes sintéticos podem manifestar. Além de que, há maior preferência dos consumidores por alimentos com aditivos naturais (ABDALLA *et al.*, 2007; HRAŠ *et al.*, 2000; LINDBERG MADSEN; BERTELSEN, 1995; NAMIKI, 1990; SALEHI *et al.*, 2005; WANASUNDARA; SHAHIDI, 1998).

A presença de compostos fenólicos polares e óleos essenciais presentes em plantas medicinais, relaciona-as como importantes antioxidantes naturais (DEMO et al., 1998; ECONOMOU; OREOPOULOU; THOMOPOULOS, 1991;



HRAŠ *et al.*, 2000). Os antioxidantes naturais podem ser retirados de diferentes partes dos vegetais tais como, sementes, raízes, folhas, flores e frutos. Os compostos típicos que possuem atividade antioxidante são tocoferóis, flavonoides, ácidos orgânicos, terpenos dentre outros (DEL RÉ; JORGE, 2012; ORSINE *et al.*, 2023).

A capacidade antioxidante dos extratos de plantas depende não somente da composição do extrato, mas também do mecanismo de ação do método que avalia o teor antioxidante. Com isso, Gupta, Shing e Sharma (2003), afirmaram que, o poder antioxidante é influenciado por diversos fatores, não podendo ser quantificado por apenas um método *in vitro*. Dessa forma, para se obter compostos antioxidantes a partir de materiais vegetais, é preciso que tenha-se um elevado rendimento no processo de extração, além disso, serem obtidos por métodos que previnam a oxidação e a degradação térmica, uma vez que os compostos bioativos são muito sensíveis ao calor (ASPÉ; FERNÁNDEZ, 2011).

Os métodos utilizados para avaliar a capacidade antioxidante podem ser baseados no poder de redução do metal (FRAP), captura do radical peroxila (ORAC, TRAP), captura do radical orgânico (ABTS, DPPH), captura do radical hidroxila (método de desoxirribose). Sendo o método por FRAP, DPPH e ABTS os mais utilizados na avaliação da atividade antioxidante de extratos vegetais, devido ser de fácil aplicação, baixo custo e rápida obtenção nos resultados (LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013).

Os métodos que avaliam os compostos fenólicos totais e o poder antioxidante estão relacionados com a capacidade de agirem como agentes redutores de oxidação e fornecedores de hidrogênio ou elétrons. Para determinação de compostos fenólicos o mais empregado para extratos vegetais é pelo método Folin-Ciocalteu. Esse método baseia-se na redução do reagente ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico pelas hidroxilas fenólicas do antioxidante em meio alcalino, resultando na formação de um radical superóxido ( $O_2^-$ ), este então reage com o molibdato e assim forma o óxido de molibdênio ( $MoO_4^+$ ) o qual possuem coloração azul, com máximo de absorbância cerca de 760 nm (ROGINSKY & LISSI, 2005; SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999; STRATIL; KLEJDUS; KUBÁŇ, 2007).

O método DPPH é de fácil aplicabilidade e amplamente empregado para avaliar a atividade antioxidante de diversos compostos. Esse método

espectrofotométrico é baseado na capacidade do antioxidante em reduzir o radical DPPH, sendo este último utilizado como reagente (PRIOR *et al.*, 2003). Assim, as amostras são capazes de reduzir o radical livre DPPH para 1–1-difenil-2 picrilhidrazil o qual possui coloração amarela. Dessa forma, o modelo de captura do radical livre DPPH é utilizado para avaliar o poder antioxidante, em um tempo de aproximadamente 30 min, medida através da diminuição da absorbância, à 515 nm, ou até que está se estabilize, resultando na mudança de cor de púrpura para amarela (AYOUB MEHTA, 2018). O ensaio por FRAP, avalia a capacidade de redução férrica, em que se baseia na redução do íon  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  presente no complexo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), tendo mudança na coloração da mistura para azul, sendo sua absorbância verificada a 595 nm (ALVES *et al.*, 2010).

Dentre as diversas plantas com poder antioxidante, as plantas da família Myrtaceae, a qual pertence a *Syzygium aromaticum* são de grande interesse industrial por apresentarem um poder antioxidante expressivo conforme relatado em estudos (FROHLICH *et al.*, 2019; RADÜNZ *et al.*, 2019; TAKAO; IMATOMI; GUALTIERI, 2015).

### **3.5 Considerações parciais**

Através da revisão realizada na literatura pode-se verificar algumas características das folhas de cravo da Índia, bem como seu potencial, visto que é rico em eugenol, um fenilpropanóide, muito utilizado na odontologia como analgésico. Também apresenta, propriedades benéficas como antioxidante e antimicrobiana.

A extração de compostos bioativos por tecnologias não convencionais, tais como  $CO_2$  supercrítico puro, solvente assistido por ultrassom e líquido pressurizado tem se mostrado mais vantajoso e atrativa em comparação aos métodos convencionais. A técnica de extração supercrítica, possibilita elevado rendimento, e ainda é considerada uma técnica limpa, onde o solvente é removido do extrato pela despressurização do sistema. O método por ultrassom e por líquido pressurizado são de grande valia, em decorrência de menor tempo de extração e diminuição no volume de solvente necessário, com obtenção de elevados rendimentos. Além disso, a PLE é um processo que permite a

combinação de temperatura e pressão com solventes líquidos permitindo além de rápida, também eficiente extração de compostos de interesse.

Visto a gama de possíveis aplicações industriais dos extratos das folhas de cravo da Índia, os trabalhos encontrados na literatura abordando métodos não convencionais (assistida por ultrassom, líquido pressurizado e, com dióxido de carbono supercrítico puro) de extração das folhas de cravo, apresentam informações escassas sobre a composição de eugenol e atividade antioxidante.

Diante do exposto, observa-se o grande potencial na utilização de folhas de cravo da Índia para obtenção de extratos e a investigação de sua capacidade nos efeitos biológicos, devido poucos estudos semelhantes. Portanto, o presente trabalho visa avaliar diferentes métodos de extração não convencionais sobre o rendimento e a composição dos extratos. Além disso, analisar o potencial nas atividades biológicas destes.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Produtos químicos e reagentes

Etanol absoluto (Panreac) foi usado nas extrações por Soxhlet, ultrassom, maceração e líquido pressurizado. Nas extrações supercríticas utilizou-se solvente dióxido de carbono de alta pureza > 99,9 % (White Martins). As análises de quantificação do eugenol exigiram padrão de eugenol (Sigma Aldrich), solvente metanol (J. T Baker) grau HPLC e, água ultrapura.

O reagente de Folin-Ciocalteu (Dinâmica), carbonato de sódio (Anidrol) e ácido gálico (Vetec) foram utilizados para análise de compostos fenólicos. O DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e TPTZ (2,4,6-tris (2-piridil) –triazina) da Sigma Aldrich, cloreto férrico hexahidratado (Biotec), acetato de sódio trihidratado, sulfato de ferro III heptahidratado e persulfato de potássio (Neon), ácido acético, ácido clorídrico, álcool etílico 99,5% (Anidrol) foram utilizados para determinação da atividade antioxidante.

### 4.2 Preparação das folhas de cravo para extração

As folhas de cravo (*Syzygium aromaticum*) foram coletadas numa propriedade rural da cidade de Santa Helena- Paraná, Brasil. Imediatamente após a colheita, o material foi submetido a secagem em estufa com circulação de ar (model TE- 394/3 – TECNAL, Piracicaba, São Paulo, Brazil) a 40 °C por 48 horas. Em seguida, realizou-se o processo de moagem em liquidificador comum (MONDIAL, Conceição e Jacupê, Bahia, Brazil) e a classificação do material por peneiramento (16-48 mesh). Para as análises utilizou-se os materiais retidos nas peneiras de 20, 28 e 32 mesh, sendo a massa de cada fração, respectivamente, 10,45, 34,99 e 20,23% (lote I) e 17,59, 38,36, 14,82% (lote II) que corresponderam às frações com maior quantidade de massa. A umidade das folhas secas e trituradas foi determinada secando a amostra a 105 °C até massa constante (AOAC, 2012).

### **4.3 Métodos de extração**

Nesta seção serão apresentados os métodos de extrações das folhas de cravo da Índia por ultrassom (UAE), líquido pressurizado e com dióxido de carbono supercrítico (SFE), bem como as extrações convencionais pelas técnicas Soxhlet e maceração.

#### **4.3.1 Extração convencional – Soxhlet**

Para a extração por Soxhlet das folhas de cravo da Índia utilizou-se o conjunto Soxhlet (Laborglass) de acordo com a metodologia proposta por Santos *et al.* (2017). Aproximadamente 10 g de folhas foram embrulhadas em papel filtro comum e colocadas em um extrator Soxhlet, o qual compõe-se de um condensador, um tubo extrator e um balão de fundo redondo aquecido com auxílio de uma manta de aquecimento (WEA-500 mL). O processo de extração, foi realizado por um período de 8 horas com 250 mL dos solventes orgânicos n-hexano, etanol e acetato de etila. Solventes estes escolhidos com intuito de testar extratores de diferentes polaridades. O condensador foi conectado a um banho termostático (Marconi, modelo MA- 184) com a temperatura mantida a 5 °C, durante todo o tempo de extração. Em seguida o extrato foi concentrado em rota evaporador (IKA, RV 10 Control) e o solvente residual removido em estufa. Os experimentos foram realizados em triplicata e o rendimento é descrito com média  $\pm$  desvio padrão.

#### **4.3.2 Extração assistida por ultrassom com solvente etanol**

O equipamento de ultrassom utilizado para a realização das extrações (SANTOS; DA SILVA; DA SILVA, 2021), consiste em um ultrassom (Sonics, VCX 750, São Paulo, Brazil) com uma sonda de titânio de 13 mm de diâmetro, a uma frequência fixa de 20 kHz e 750 W. Possui ainda, uma célula de vidro de 250 mL interligada a um banho termostático (Quimis, Q214M2) sendo esta, utilizada para controlar na temperatura desejada de extração. A ponta da sonda ultrassônica foi submersa cerca de 1 cm de profundidade na mistura (amostra + solvente).

As extrações assistidas por ultrassom das folhas de cravo foram realizadas seguindo um planejamento composto central (CCD), contendo quatro (4) variáveis e três (3) repetições no ponto central, com um total de 27 experimentos. As quatro variáveis estudadas foram: temperatura (30 °C – 70 °C), relação volume solvente/amostra folhas de cravo (15 mL g<sup>-1</sup> - 35 mL g<sup>-1</sup>), amplitude (25% - 85%) e tempo (5 min - 25 min). Os níveis das variáveis foram baseados no estudo de Ismail *et al.* (2019). O solvente álcool etílico foi utilizado num volume de 50 mL para todas as extrações.

Ao término das extrações as amostras foram filtradas com auxílio de uma bomba a vácuo e removeu o solvente com um evaporador rotativo (IKA, RV 10 Control, Wilmington, USA) a 40 °C. As amostras foram armazenadas sob refrigeração até o momento das análises. Os rendimentos foram calculados pela razão entre a massa extraída e a massa inicial de folhas (base seca). Os dados experimentais foram analisados utilizando Statistica TM, versão 7.0, software (Statsoft) a 5% de significância. Além disso, foram realizadas análises de superfície de resposta.

O modelo polinomial de segunda ordem (Eq. 4.1) foi utilizado para ajustar os resultados experimentais.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i x_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n \beta_{ij} x_i x_j \quad (4.1)$$

Onde Y é a resposta prevista da variável dependente (rendimentos de extrato e eugenol, bem como de capacidade antioxidante TCF, DPPH e FRAP),  $x_i$  são as variáveis estudadas, com n=4 variáveis,  $\beta_0$  o termo independente (intercepto),  $\beta_i$  os coeficientes dos termos lineares,  $\beta_{ii}$  os coeficientes dos termos quadráticos e  $\beta_{ij}$  os coeficientes dos termos de interação.  $x_1$  – tempo de extração,  $x_2$  - % de amplitude,  $x_3$  - razão solvente/amostra,  $x_4$  - temperatura de extração.

#### 4.3.3 Extração convencional – Maceração dinâmica

As extrações por maceração dinâmica com solvente etanol, foram realizadas utilizando Shaker (TECHNAL TE-421, Brazil) durante 20 min com velocidade de agitação de 100 rpm. Após a filtração a vácuo, o solvente foi

removido com auxílio de um evaporador rotativo a 60 °C. As condições de experimentos foram determinadas de acordo com a condição de maior rendimento obtido no delineamento experimental da extração assistida por ultrassom, afim de comparação dos resultados alcançado pela extração convencional.

#### **4.3.4 Extração com CO<sub>2</sub> supercrítico**

A obtenção dos extratos das folhas trituradas de *S. aromaticum* com CO<sub>2</sub> supercrítico foi realizada em um módulo composto por um cilindro de CO<sub>2</sub>, uma bomba seringa (Isco, 500model), dois banhos termostáticos, um responsável pelo resfriamento do CO<sub>2</sub> na bomba e outro por aquecer o leito de extração. Além de, um leito encamisado de aço (dimensões: 1,91 de cm, altura de 16,8 cm) e uma válvula micrométrica do controlador de taxa de fluxo.

Para avaliar o efeito das variáveis independentes, temperatura e pressão, na extração com CO<sub>2</sub> supercrítico foi elaborado um planejamento experimental completo 2<sup>2</sup> com ponto central. Os níveis das variáveis foram: temperatura 40, 50 e 60 °C, pressão 200, 250 e 300 bar com vazão de 3 mL min<sup>-1</sup>. As condições operacionais foram estabelecidas conforme limitações operacionais do equipamento. A variável resposta analisada no planejamento experimental foi o rendimento das extrações e o teor de eugenol.

O extrator foi preenchido com aproximadamente 7,5 gramas da amostra triturada. O solvente, foi resfriado a 5 °C, pressurizado até a pressão desejada e em seguida bombeado para o extrator, estabelecido na temperatura de extração, onde mantida em contato com a amostra por 30 minutos antes de abertura da válvula para retirada da amostra.

Durante o processo de extração, os extratos eram coletados em frascos âmbar e pesados em abalança analítica a cada 10 minutos até 80 minutos, tempo total de cada extração. Com os valores encontrados da massa de extrato acumulada, foram geradas curvas de cinética de extração. Os extratos foram armazenados em frascos âmbar e mantidos sobre refrigeração até realização das análises.

A solubilidade aparente (Y<sub>s</sub>) foi obtida pelo método dinâmico de extração (Reis *et al.*, 2016), onde a solubilidade é representada pela inclinação da parte

linear das curvas de extração (CER). A curva cinética de extração para cada condição foi usada para determinação da solubilidade aparente neste experimento, conforme a Equação 4.2.

$$Y_s = \frac{m_{extrato}}{m_{solvente}} \quad (4.2)$$

Em que:

$Y_s$ : solubilidade do extrato no solvente ( $\text{g g}^{-1}$ );

$m_{extrato}$ : massa total de extrato obtido no início da extração (parte linear) (g);

$m_{solvente}$ : massa de solvente consumido no início da extração (parte linear) da curva de extração (g).

#### 4.3.5 Extração com líquido pressurizado –PLE

As folhas de cravo foram submetidas a PLE utilizando uma unidade de escala laboratorial constituído de um reservatório do solvente, uma bomba de líquido de alta pressão (Waters, 515), uma coluna de aço inox de  $14,3 \text{ cm}^3$  (7,8 mm de diâmetro e 30 cm de comprimento), aquecida por resistências elétricas e, uma válvula micrométrica de pressão no final do extrator.

O leito foi preenchido com aproximadamente 4 gramas de folhas trituradas, em cada extração. As extrações foram realizadas em três temperaturas de 40, 50 e 60 °C e pressão constante de 100 bar, conforme metodologia descrita por Santos *et al.* (2020). O solvente etanol foi bombeado à vazão volumétrica de  $2 \text{ mL min}^{-1}$  e, após atingir a pressão definida, a válvula de controle de pressão foi aberta para coleta da amostra. O tempo total de extração foi fixado em 20 min após avaliação da curva cinética. Após a extração, o solvente foi evaporado usando um evaporador rotativo a 50 °C.



## 4.4 Caracterização da amostra

### 4.4.1 Quantificação do Eugenol

A quantificação do eugenol presente nos extratos das folhas de cravo obtidos por ultrassom, maceração, líquido pressurizado e com CO<sub>2</sub> supercrítico foi determinada seguindo a metodologia descrita por Frohlich *et al.*, (2019) em um cromatógrafo líquido (LC-20AT, acoplado a um SPD-20 A UV-VIS, Shimadzu, Tóquio, Japão) equipado com uma Coluna C18 Phenomenex Kinetex (4,6 mm x 250 mm x 5 mm). A fase móvel foi metanol: água (60:40 v/v) mantida em um fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, e o tempo de corrida foi de 15 min. As amostras foram diluídas em isopropanol na concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup>. O comprimento de onda utilizado para a detecção foi de 215 nm.

Para quantificação foi construída uma curva padrão obtida das soluções padrão de eugenol (Sigma Aldrich) com concentrações de 0,01 a 0,10 mg mL<sup>-1</sup> em isopropanol, com R<sup>2</sup> = 0,9993. A análise foi realizada em duplicata.

### 4.4.2 Determinação da atividade antioxidante

#### 4.4.2.1 Determinação pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

As análises de DPPH, para as amostras obtidas por UAE, maceração, PLE e com CO<sub>2</sub> supercrítico foram determinadas conforme metodologia descrita por Enujiugha *et al.* (2012). As amostras foram avaliadas numa concentração de 0,2 mg mL<sup>-1</sup> diluídos em etanol. A curva padrão foi obtida das soluções padrão de trolox (25–500 µmol L<sup>-1</sup> diluído em álcool etílico), com R<sup>2</sup> = 0,9987. A análise foi realizada em triplicata. Os resultados foram expressos em µmol de Trolox por mg de extrato.

#### 4.4.2.2 Determinação pela redução de ferro (FRAP)

O FRAP nas amostras obtidas por UAE, maceração, PLE e com CO<sub>2</sub> foi realizado conforme a metodologia descrita por Frohlich *et al.*, (2019). Uma curva de calibração com sulfato ferroso de 0-2000 µmol mg<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> = 0,998) foi utilizada para determinar a capacidade antioxidante. Para reação, utilizou-se uma

alíquota (90 µL) da solução etanólica dos extratos (0,02 mg mL<sup>-1</sup>), 270 µL de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP e incubados em banho-maria a 37 °C por 5 minutos. Em seguida, as leituras da absorvância foram feitas a 595 nm, usando um espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu). A análise foi realizada em triplicata. Os resultados foram expressos em µmol Fe<sup>2+</sup> mg<sup>-1</sup> de extrato.

#### **4.4.3 Quantificação dos compostos fenólicos**

O teor de compostos fenólicos totais das amostras obtidas pelos métodos maceração e ultrassom foi determinado usando o reagente de Folin-Ciocalteu, conforme a metodologia de Singleton e Rossi (1965). Os extratos foram dissolvidos em etanol para obter uma concentração de 0,15 mg mL<sup>-1</sup>. Os experimentos foram realizados em triplicada. A curva padrão foi preparada com ácido gálico em concentrações de 10 a 100 µg mL<sup>-1</sup>. A absorvância foi medida em um espectrofotômetro (UV/VIS PG Instruments T80 +, Shimadzu, Tóquio, Japão) a 760 nm. Os resultados foram expressos em µg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por mg de amostra.

#### **4.5 Análises Estatística**

As diferenças significativas entre as médias dos resultados experimentais, a um nível de 95% de confiança, de rendimento de extrato, rendimento de eugenol, teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante foram analisadas pelo teste de Tukey. O software Statistica<sup>TM</sup> 7.0 (Statsoft) foi empregado nas análises estatísticas.

### **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **5.1 Caracterização das folhas de cravo da índia**

O material vegetal triturado e seco em estufa a 40 °C por 48 horas, apresentou umidade de 4,46% (lote I) e 7,06% (lote II). A redução do teor de umidade depois do processo de secagem, garantem a estabilidade do produto.

A diminuição da disponibilidade de água nas folhas, evita transformações dos compostos presentes nas plantas, causadas por processos químicos, bioquímicos e microbiológicos. Além de possibilitar uma conservação maior de tempo das plantas (Souza, Bott, Oliveira, 2007). Ademais, dependendo do método aplicado e, teor de umidade presente no material, estes, podem influenciar negativamente o rendimento de extração (POURMORTAZAVI; HAJIMIRSADEGHI, 2007).

A secagem das plantas verdes deve ser até que atinja umidade em até 12%, dependendo da espécie e parte da planta em análise (IVANOVIC *et al.*, 2011). Dentro dessa faixa de umidade, conforme recomendação da legislação brasileiras sobre plantas medicinais, aromáticas e condimentares, evita a deterioração e desenvolvimento de microrganismos (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019). O material estando dentro dessa porcentagem estabelecida, esta, se torna insignificante na influência quanto a transferência de massa e a solubilidade do extrato (IVANOVIC *et al.*, 2011).

## **5.2 Métodos de Extração**

### **5.2.1 Método convencional – Soxhlet**

No presente estudo, inicialmente, avaliou-se a influência do solvente orgânico em relação ao rendimento de extração, sob emprego do método convencional Soxhlet, com intuito de definir o melhor solvente para utilizar nos demais métodos de extração. Os solventes orgânicos avaliados foram etanol, acetato de etila e *n*-hexano. Na Tabela 5.1, apresenta as condições empregadas, a polaridade de cada solvente e os respectivos rendimentos obtidos para cada solvente utilizado.

**Tabela 5.1.** Condições empregadas, polaridade dos solventes e rendimentos obtidos nas extrações por Soxhlet com solventes orgânicos

Método	Solvente	Índice de Polaridade <sup>1</sup>	Tempo (horas)	Rendimento (%)
Soxhlet	Hexano	0,0	8	1,90 ± 0,08
	Acetato de etila	4,4	8	8,08 ± 0,06
	Etanol	5,2	8	26,25 ± 0,56

<sup>1</sup>Rodríguez-Solana *et al.* (2014).

Dentre os rendimentos obtidos, nota-se que houve influência da polaridade dos solventes no rendimento final, onde o maior rendimento foi encontrado quando avaliado com solvente etanol, solvente este que apresenta maior polaridade dentre os solventes testados. Isso, justifica-se que a maior parte dos compostos presentes nas folhas de cravo apresentam carácter polar. Todavia, nas extrações com solvente de menor polaridade, observa-se menores rendimento, logo, infere-se menor concentração de compostos apolares presentes na matriz da amostra.

Vários estudos foram realizados em plantas usando diferentes solventes de extração com diferentes polaridades, para avaliar o rendimento de extração e composição do extratos, onde o etanol se mostrou mais rentável devido sua alta polaridade (ALMEIDA; MEZZOMO; FERREIRA, 2012; TSIMOGIANNIS; STAVRAKAKI; OREOPOULOU, 2006). Ademais, quanto à solubilidade, critério importante na escolha do solvente, o etanol apresenta eficiência satisfatória em temperaturas próximas ao seu ponto de ebulição (SMALLWOOD, 1993).

O etanol também é aplicado na indústria farmacêutica, como um excipiente, apresentando vantagens devido a sua dupla função na utilização, podendo ser utilizado como solvente ou conservante (SENA, 2014). Além disso, Tomazin Jr (2008) cita outras vantagens do uso do solvente etanol: é um solvente biodegradável e atóxico, quando utilizando em pequenas quantidades. Com isso, esse solvente mostra favorável a sua aplicação para extrações de plantas medicinais, uma vez que além dos fatores ambientais também é favorecido por fatores econômicos, devido grande produção em território brasileiro (em média 400 mil litros por dia, no ano de 2021) (EMBRAPA, 2021).

Como o maior rendimento da extração por Soxhlet foi encontrado utilizando o solvente etanol e devido suas grandes vantagens em sua aplicação,

considerou-se, no presente estudo, a utilização deste solvente orgânico para aplicação nos demais métodos de extração a serem analisados.

## **5.2.2 Extração Assistida por ultrassom e Maceração**

### **5.2.2.1 Rendimento**

Para as extrações das folhas de cravo da índia assistida por ultrassom e pelo método convencional, maceração, selecionou-se o solvente etanol, devido ao maior rendimento obtido nos extratos e vantagens de uso com este solvente, cujo são apresentados na seção 5.2.1.

Na Tabela 5.2 são apresentas as condições experimentais de tempo ( $x_1$ ), amplitude ( $x_2$ ), razão solvente/amostra ( $x_3$ ) e temperatura ( $x_4$ ), de acordo com o planejamento CCD.

O maior rendimento obtido foi de 11,95% que corresponde ao ensaio 17 que empregou as seguintes condições: amplitude de 70%, temperatura de 60 °C, razão de 30 (mL g<sup>-1</sup>) e tempo de extração de 20 minutos. Já o menor rendimento (5,79%) foi observado na mesma amplitude, porém com tempo de 10 minutos, temperatura de 40 °C e razão de 20 mL g<sup>-1</sup>.

O rendimento da extração pelo método convencional, por maceração dinâmica, para a condição de 60 °C e tempo de 20 minutos (condição esta na qual obteve-se maior rendimento encontrado pelo método UAE), foi de 4,56%, sendo este valor inferior até mesmo a condição que se obteve o menor rendimento obtido pela extração assistida por ultrassom.

**Tabela 5.2.** Condições experimentais e rendimentos, obtidos pela extração assistida por ultrassom e maceração.

Experimentos	X <sub>1</sub> - Tempo (min)	X <sub>2</sub> - Amplitude (%)	X <sub>3</sub> – Razão Solvente/amostra (mL/g)	X <sub>4</sub> - Temperatura (°C)	Rendimento (%)
1	15	55	25	30	8,07
2	10	40	20	40	6,61
3	20	40	20	40	8,69
4	10	70	20	40	5,79
5	20	70	20	40	9,05
6	10	40	30	40	6,67
7	20	40	30	40	8,82
8	10	70	30	40	8,00
9	20	70	30	40	10,12
10	10	40	20	60	8,22
11	20	40	20	60	10,21
12	10	70	20	60	8,87
13	20	70	20	60	10,57
14	10	40	30	60	8,68
15	20	40	30	60	10,36
16	10	70	30	60	9,23
17	20	70	30	60	11,95
18	15	55	25	70	11,20
19	5	55	25	50	6,31
20	25	55	25	50	10,05
21	15	25	25	50	6,97
22	15	85	25	50	10,03
23	15	55	15	50	8,92
24	15	55	35	50	9,67
25	15	55	25	50	9,30 ± 0,28
Maceração					4,56 ± 0,29

Pujiarti *et al.* (2020) e Raina *et al.* (2001) avaliaram o rendimento das folhas de cravo extraídos por hidrodestilação, o rendimento obtido foi de 2,67% e 4,8% respectivamente. Gaylor *et al.* (2016) além do rendimento analisaram a concentração de eugenol presente. Os valores encontrados foram 5,1% para o rendimento de óleo, e 88,5% de eugenol. Srivastava; Srivastava; Syamsundar (2005) e Bhuiyan (2012) encontram 82% e 74,8%, respectivamente, de eugenol em óleos extraídos por hidrodestilação. Valores de rendimento que são menores, em relação aos valores encontrados no presente estudo. Isto justifica-se, devido a extração por hidrodestilação, ocorrer a extração de apenas compostos voláteis,

diferentemente aos processos por métodos não convencionais, como UAE, uma vez que, a extração com solvente etanol possibilita a extração de outras mais classes de compostos bioativos, tais como taninos, polifenóis, terpenóides e alcaloides (COWAN, 1999).

O maior rendimento obtido pela UAE, em relação ao método de maceração, justifica-se pelo favorecimento na remoção de extrato. Uma vez que, o processo de ultrassom através de rupturas, modifica a estrutura dos tecidos vegetais, aumentando a porosidade e espaços intercelulares, dessa forma, diminuiu a resistência de transferência de massa do soluto, o qual, aumenta a penetração do solvente no tecido da planta (TETIK; YÜKSEL, 2014; YINGNGAM; MONSCHEIN; BRANTNER, 2014). Resultados semelhantes também foram relatos por outros autores onde a UAE se mostrou mais eficiente do que aos métodos convencionais de maceração e Soxhlet (CHEN *et al.*, 2014; STEVANATO; DA SILVA, 2019; PALSIKOWSKI *et al.*, 2020; SANTOS; DA SILVA; DA SILVA, 2021).

Os resultados foram ajustados ao modelo dado pela Equação 1 e após, os modelos foram avaliados por análise de variância (ANOVA) ao nível de significância de 5%.

Na Tabela 5.3 é apresentado a análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos na matriz do *desing* do composto central para o rendimento. O *p*-valor foi utilizado para verificar a significância de cada coeficiente bem com a significância da falta de ajuste e do modelo. O modelo ajusta satisfatoriamente os dados experimentais, no nível de significância de 0,05, quando, ao mesmo tempo, o *p*-valor da falta de ajuste for maior que 0,05 e o *p*-valor do modelo for menor que 0,05. Conforme a Tabela 5.3, o rendimento mostrou um alta precisão do modelo ( $R^2=0,9575$ ) sugerindo assim uma forte correlação entre os dados experimentais.

**Tabela 5.3.** ANOVA para o modelo quadrático de rendimento do planejamento CCD.

	Rendimento				
	Soma quadrática	GL <sup>1</sup>	Média quadrática	F-valor	p-valor
<b>Linear</b>					
X <sub>1</sub>	26,4180	1	26,4180	216,4820	0,0046
X <sub>2</sub>	5,4531	1	4,4531	44,6851	0,0216
X <sub>3</sub>	2,2326	1	2,2326	18,2950	0,0505
X <sub>4</sub>	17,6817	1	17,6817	144,8921	0,0068
<b>Interações</b>					
X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub>	0,2256	1	0,2256	1,8489	0,3069
X <sub>1</sub> .X <sub>3</sub>	0,0081	1	0,0081	0,0664	0,8207
X <sub>1</sub> .X <sub>4</sub>	0,1444	1	0,1444	1,1833	0,3903
X <sub>2</sub> .X <sub>3</sub>	1,1130	1	1,1130	9,1207	0,0943
X <sub>2</sub> .X <sub>4</sub>	0,0600	1	0,0600	0,4919	0,5557
X <sub>3</sub> .X <sub>4</sub>	0,0784	1	0,0784	0,6424	0,5069
<b>Quadrática</b>					
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0,9222	1	0,9222	7,5572	0,1107
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0,3490	1	0,3490	2,8606	0,2328
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0,2232	1	0,2232	0,8771	0,4478
X <sub>4</sub> <sup>2</sup>	0,5180	1	0,5180	144,8921	0,1755
Falta de Ajuste	2,2485	10	0,2248	1,8425	0,4026
Erro Puro	0,2441	2	0,1220		
Resíduo	2,49	12	0,2077		
Modelo	56,20	14	4,0140	19,3248	<0,001
Total	58,6885	26			
R <sup>2</sup>	0,9575				
R <sup>2</sup> ajustado	0,9080				

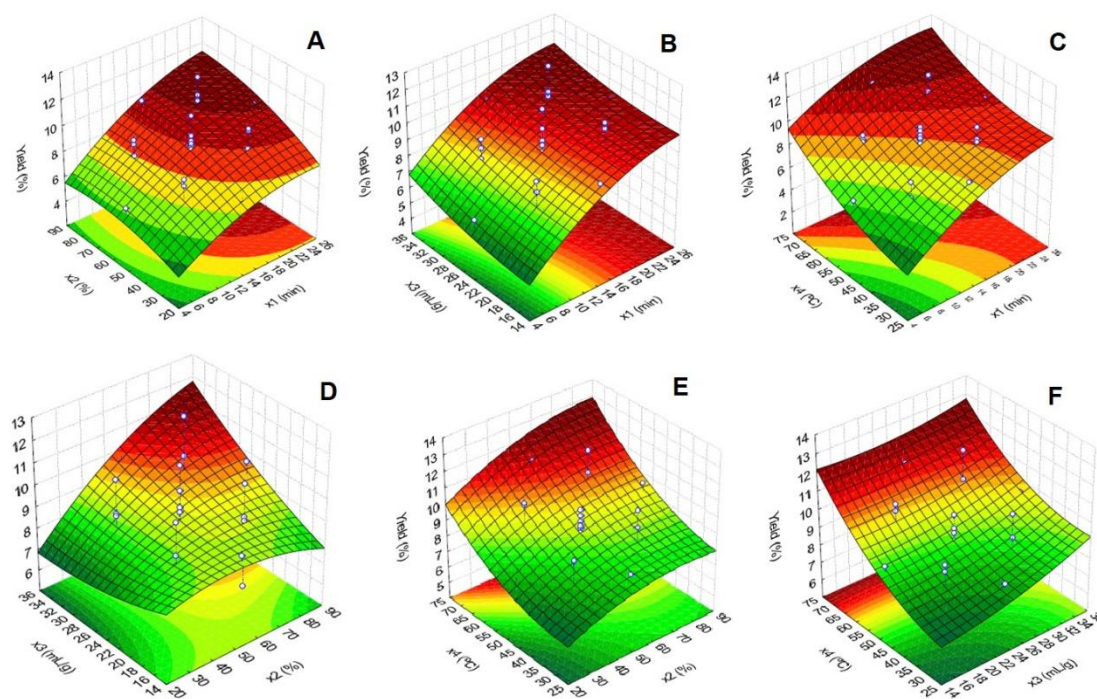
x<sub>1</sub> –tempo; x<sub>2</sub>- Amplitude; x<sub>3</sub>- Razão solvente/amostra; x<sub>4</sub>- Temperatura

A equação polinomial de segunda ordem para a predição dos rendimentos ( $Y_{YIELD}$ ) em função das variáveis tempo de extração ( $x_1$ ), % de amplitude ( $x_2$ ), razão solvente/amostra ( $x_3$ ) e temperatura de extração ( $x_4$ ) é dada abaixo (Equação 5.1):

$$\begin{aligned}
 Y_{YIELD} = & 1.93 + 4.73 \cdot 10^{-1} \cdot x_1 - 3.21 \cdot 10^{-2} \cdot x_2 - 1.01 \cdot 10^{-1} \cdot x_3 - \\
 & 1.45 \cdot 10^{-2} \cdot x_4 - 8.65 \cdot 10^{-3} \cdot x_1^2 - 6.28 \cdot 10^{-4} \cdot x_2^2 - 1.95 \cdot 10^{-3} \cdot x_3^2 - \\
 & 1.30 \cdot 10^{-3} \cdot x_4^2 + 1.77 \cdot 10^{-3} \cdot x_1 \cdot x_2 - 1.6 \cdot 10^{-3} \cdot x_1 \cdot x_3 - 1.45 \cdot 10^{-3} \cdot x_1 \cdot x_4 + \\
 & 3.12 \cdot 10^{-3} \cdot x_2 \cdot x_3 - 5.25 \cdot 10^{-4} \cdot x_2 \cdot x_4 - 1.67 \cdot 10^{-3} \cdot x_3 \cdot x_4
 \end{aligned} \quad (5.1)$$



Com base nos resultados do teste da ANOVA (Tabela 5.3), as quatro variáveis avaliadas tiveram os termos lineares positivos e significativos ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) para o rendimento. Quanto aos termos quadráticos e interações entre as variáveis, nenhuma se mostrou significativa. Os efeitos das variáveis no rendimento de extrato são apresentados nas superfícies de resposta da Figura 5.1.



**Figura 5.1.** Superfície de resposta ilustrando os efeitos das variáveis independentes no rendimento da extração assistida por ultrassom. **A:** Variáveis:  $x_1$  (tempo) e  $x_2$  (amplitude) e constante  $x_3$  (25 mL g<sup>-1</sup>) e  $x_4$  (50 °C). **B:** Variáveis:  $x_1$  (tempo) e  $x_3$  (solvente/amostra) e constante  $x_2$  (55%) e  $x_4$  (50 °C). **C:** Variáveis:  $x_1$  (tempo) e  $x_4$  (temperatura) e constante  $x_3$  (25 mL g<sup>-1</sup>) e  $x_2$  (55%). **D:** Variáveis:  $x_2$  (amplitude) e  $x_3$  (solvente/amostra) e constante  $x_1$  (15 min) e  $x_4$  (50 °C). **E:** Variáveis:  $x_2$  (amplitude) e  $x_4$  (temperatura) e constante  $x_3$  (25 mL g<sup>-1</sup>) e  $x_1$  (15 min). **F:**  $x_3$  (solvente/amostra) e  $x_4$  (temperatura) e constante  $x_1$  (15 min) e  $x_2$  (55%).

#### 5.2.2.1.1 Efeito do tempo (min)

Conforme mostra a Tabela 5.2, percebe-se que o rendimento do extrato aumenta no intervalo de tempo de extração de 10 para 20 min, mantendo constante as variáveis, amplitude, razão solvente/amostra e temperatura. Resultado este, que mostrou efeito significativo ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) do tempo sobre

o rendimento obtidos dos extratos das folhas de cravo. Este comportamento pode ser atribuído à cavitação e aos efeitos térmicos do processo assistido por ultrassom, que causam rompimento da parede celular, o que intensifica a transferência de massa e favorecem a obtenção de maiores rendimentos (ESCLAPEZ *et al.*, 2011; VAJIC *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2017).

A extração por ultrassom, pode ser dividida em dois períodos de extração. O primeiro, que consiste no período de lavagem, onde ocorre a extração dos compostos solúveis presentes na superfície do vegetal, tendo um aumento rápido no rendimento. Já a segunda etapa, é a fase lenta de extração, a qual indica a transferência de massa do soluto da matriz do vegetal ao solvente por difusão ou fenômenos osmóticos (ISMAIL *et al.*, 2019; MOHAMMADPOUR *et al.*, 2019; ŞAHIN; ŞAMLI, 2013).

A Figura 5.1A, representa como o rendimento se comporta a medida em que o tempo e a amplitude variam, nesta, observa-se que o rendimento é crescente a medida em que aumenta os valores das variáveis. Além disso, nas Figuras 5.1B e 5.1C, evidenciam respectivamente, como o rendimento procede conforme os valores de tempo e amplitude e, tempo e temperatura se alteram. Ainda, como para as demais interações, os maiores rendimentos são observados para as condições de maiores valores para as variáveis.

#### 5.2.2.1.2 Efeito da amplitude (%)

Foram investigadas diferentes potências ultrassônicas de 25, 40, 55, 70 e 85%, para avaliar o rendimento do extrato das folhas de cravo. Como pode-se verificar na Tabela 5.2, a amplitude mostrou efeito positivo sobre o rendimento de extrato obtidos. Analisando o aumento da amplitude de 40 a 70%, fixando as demais variáveis o ponto central, percebe-se que o rendimento aumenta, (experimentos 15 e 17), com uma variação de aproximadamente 15% dentre os rendimentos. Este efeito, pode ser devido a cavitação aprimorada e efeito mecânico do ultrassom, o qual, possibilita o aumento da área da superfície de contato entre o sólido e líquido, assim, causa maior penetração do solvente na matriz do vegetal (GOULA *et al.*, 2017).

Todavia, percebe-se um declínio no rendimento quando testado na amplitude de 85% (Fig. 5.1D), com rendimento 10,03%, em relação ao maior

rendimento (11,42%, amplitude 70%, experimento 17). Comportamento esse, também foi relatado por Vuong *et al.* (2014) e Mohammadpour *et al.* (2019). Isso, pode ser em decorrência de que, a um certo nível do poder ultrassônico, a formação de bolhas de cavitação será alto e sem precedentes, o que fortalece a dissipação de energia entre bolhas de cavitação e leva ao seu colapso insuficiente, causando a redução da eficiência de transferência de energia e rendimento de extração (MOHAMMADPOUR *et al.*, 2019). Na Figura 5.1C, verifica-se que há pequena variação no rendimento com o aumento da amplitude para temperaturas baixas.

Dessa forma, a faixa de 25 a 70% de amplitude foi considerada ideal na eficiência de extração assistida por ultrassom para o rendimento.

#### 5.2.2.1.3 Efeito da razão/solvente ( $\text{mL g}^{-1}$ )

A razão de solvente/amostra ( $\text{mL g}^{-1}$ ) foi avaliada na faixa de 15  $\text{mL g}^{-1}$ , 25  $\text{mL g}^{-1}$  e 35  $\text{mL g}^{-1}$ . Na Tabela 5.2, verifica-se que com o aumento da razão até 30  $\text{mL g}^{-1}$  considerando as demais variáveis constantes, o rendimento de extrato se elevou gradativamente, como por exemplo, nos experimentos 13 e 17, onde, obteve-se rendimentos de 10,57% e 11,95%, respectivamente. Todavia, o rendimento diminuiu quando testada na maior concentração, 35  $\text{mL g}^{-1}$ . Esse efeito é justificado, devido a ocorrência de uma solução muito diluída, tem-se uma diminuição no fenômeno de cavitação, resultando em um efeito negativo sobre o rendimento do extrato (ZHAO; KWOK; LIANG, 2007).

Além disso, na Figura 5.1B, observa-se a relação do rendimento em decorrência dos valores de razão solvente/amostra e amplitude, o qual, é possível verificar que o rendimento é encontrado nos níveis mais altos de razão solvente/amostra e amplitude, não sendo muito significativo no aumento da razão solvente/amostra, em amplitudes menores. Todavia, na Figura 5.1F, um aumento da temperatura em razão solvente/amostra mais baixas, tem-se um efeito pouco significativo sobre o rendimento.

#### 5.2.2.1.4 Efeito da temperatura (°C)

Como representado na Tabela 5.2 (experimentos 1 e 18) houve um aumento no teor de extrato quando a temperatura aumentou de 30 °C para 70 °C, considerando, as variáveis de 55% amplitude, 25 mL g<sup>-1</sup> e, 15 min de extração. Isso, deve-se ao aumento da temperatura resultar em uma maior energia cinética, acarretando em maior solubilidade e, elevada taxa de difusão (MOHAMMADPOUR *et al.*, 2019).

Nas Figuras 5.1E e 5.1F, é ilustrado como o rendimento se procede à medida em que a amplitude e temperatura, e temperatura e a razão solvente/amostra, respectivamente, variam. Em ambas as Figuras, nota-se que à medida em que cada variável aumenta, ocorre um efeito positivo no rendimento de extrato. Ainda, a Fig. 5.1C, confirmou que a temperatura teve um efeito significativo ( $p$ -valor < 0,05). Este resultado está de acordo com o estudo de Zhao, Kwok e Liang (2007), o qual, investigou o efeito de vários fatores (tempo, temperatura, poder ultrassom, tamanho de partícula, razão solvente/sólido e concentração de solvente) na extração assistida por ultrassom de *Radix Bupleuri*.

A faixa de temperatura de 30-70 °C, portanto, se mostrou eficiente no rendimento dos extratos das folhas de cravo.

#### 5.2.2.2 Otimização do Processo

Através da equação de predição (Equação 2) a condição experimental que permite a maximização da extração etanólica das folhas de cravo dentro dos níveis estabelecidos foi: tempo 25 min, amplitude de 85 %, razão solvente/amostra 35 mL g<sup>-1</sup> e temperatura de 70°C. Os experimentos foram realizados em triplicata e resultaram em um rendimento de 14,63 ± 0,81 %. A Tabela 5.4, mostra que os valores obtidos experimentalmente estão próximos aos valores preditos confirmando a previsibilidade dos modelos de extração das folhas de cravo sob condição máxima das variáveis de extração.

**Tabela 5.4.** Rendimento do extrato de folha de cravo obtido pela extração assistida por ultrassom, com etanol como solvente.

Experimentos	Rendimento Predito (%)	Rendimento Observado (%)
13 <sup>1</sup>	10,86	10,57
17 <sup>2</sup>	11,81	11,95
18 <sup>3</sup>	11,32	11,20
Máximo rendimento <sup>4</sup>	16,17	14,63 ± 0,81

<sup>1</sup>20 min, 70%, 20 mL g<sup>-1</sup>, 60 °C; <sup>2</sup>20 min, 70%, 30 ml g<sup>-1</sup>, 60 °C; <sup>3</sup>15 min, 55%, 25 mL g<sup>-1</sup>, 70 °C; <sup>4</sup>25 min, 85%, 35 mL g<sup>-1</sup>, 70 °C.

### 5.2.2.3 Rendimento de eugenol

Visto que o composto eugenol, é o principal composto bioativo característico da espécie do material vegetal em estudo (FROHLICH *et al.*, 2019; GUAN *et al.*, 2007; TEKIN; AKALIN; ŞEKER, 2015) a quantificação do composto foi realizada através da cromatografia líquida, para os extratos obtidos pela extração assistida por ultrassom e por maceração das folhas de cravo. O rendimento de eugenol, expresso como gramas de eugenol por kg de folhas (Tabela 5.5), foi obtido a partir de dados de concentração do composto e de rendimento de extrato (base seca).

Conforme mostrado na Tabela 5.5, ao nível de significância de 5%, é possível verificar que houve diferença significativa no rendimento de eugenol entre as diferentes condições experimentais de extração assistida por ultrassom, bem como, para os dois métodos de extração. O maior valor de eugenol (2,94 ± 0,06 g eugenol por kg folhas) pode ser observado no experimento 5, quando extraído sob a condição de 70% de amplitude, razão de 20 (g mL<sup>-1</sup>), temperatura de 40 °C com tempo de extração de 20 minutos. Já o menor valor do composto (0,62 ± 0,01g eugenol kg folhas) foi obtido na seguinte condição de extração: 25% de amplitude, razão de 25 (g mL<sup>-1</sup>), temperatura de 50 °C com tempo de extração de 15 minutos (experimento 21).

**Tabela 5.5.** Condições experimentais, teor e rendimento de eugenol obtidos pela extração assistida por ultrassom e maceração.

Experimentos	X <sub>1</sub> - Tempo (min)	X <sub>2</sub> - Amplitude (%)	X <sub>3</sub> - razão Solvente/amostra (mL/g)	X <sub>4</sub> - Temperatura (°C)	Eugenol (%) <sup>1</sup>	g eugenol kg folhas <sup>-1</sup>
1	15	55	25	30	2,84	2,29 ± 0,09 <sup>j</sup>
2	10	40	20	40	2,29	1,52 ± 0,04 <sup>e, f, g</sup>
3	20	40	20	40	1,93	1,68 ± 0,21 <sup>f, g, h, l</sup>
4	10	70	20	40	2,97	1,72 ± 0,04 <sup>g, h, l</sup>
5	20	70	20	40	3,25	2,94 ± 0,06 <sup>k</sup>
6	10	40	30	40	2,03	1,42 ± 0,04 <sup>d, e, f</sup>
7	20	40	30	40	2,16	1,90 ± 0,03 <sup>i</sup>
8	10	70	30	40	2,16	1,72 ± 0,03 <sup>g, h, l</sup>
9	20	70	30	40	2,80	2,83 ± 0,01 <sup>k</sup>
10	10	40	20	60	1,57	1,29 ± 0,01 <sup>c, d, e</sup>
11	20	40	20	60	1,16	1,18 ± 0,01 <sup>c, d</sup>
12	10	70	20	60	1,67	1,48 ± 0,04 <sup>e, f, g</sup>
13	20	70	20	60	1,23	1,30 ± 0,02 <sup>c, d, e</sup>
14	10	40	30	60	1,05	0,91 ± 0,02 <sup>a, b</sup>
15	20	40	30	60	0,88	0,91 ± 0,01 <sup>a, b</sup>
16	10	70	30	60	1,62	1,50 ± 0,09 <sup>e, f, g</sup>
17	20	70	30	60	1,91	2,29 ± 0,08 <sup>i</sup>
18	15	55	25	70	1,05	1,18 ± 0,02 <sup>c, d</sup>
19	5	55	25	50	1,75	1,11 ± 0,03 <sup>b, c</sup>
20	25	55	25	50	2,31	2,32 ± 0,01 <sup>i</sup>
21	15	25	25	50	0,94	0,65 ± 0,01 <sup>a</sup>
22	15	85	25	50	1,32	1,63 ± 0,04 <sup>f, g, h</sup>
23	15	55	15	50	2,75	2,45 ± 0,11 <sup>j</sup>
24	15	55	35	50	1,32	1,28 ± 0,04 <sup>c, d, e</sup>
25	15	55	25	50	2,03	1,80 ± 0,01 <sup>h, l</sup>
Maceração					2,99	1,36 ± 0,05 <sup>c, d, e</sup>

<sup>1</sup> gramas de eugenol por 100 g de extrato.

Letras iguais na mesma coluna e para o mesmo método de extração indicam que não houve diferença significativa ao nível de 5%.

Pelo método de maceração o rendimento de eugenol encontrado foi de 1,30 g eugenol kg folhas. Resultado este, que mostra que a extração por ultrassom é mais favorável para extração do composto eugenol, uma vez que o maior valor obtido pela extração por ultrassom foi aproximadamente duas vezes maior do rendimento de eugenol obtido por maceração.

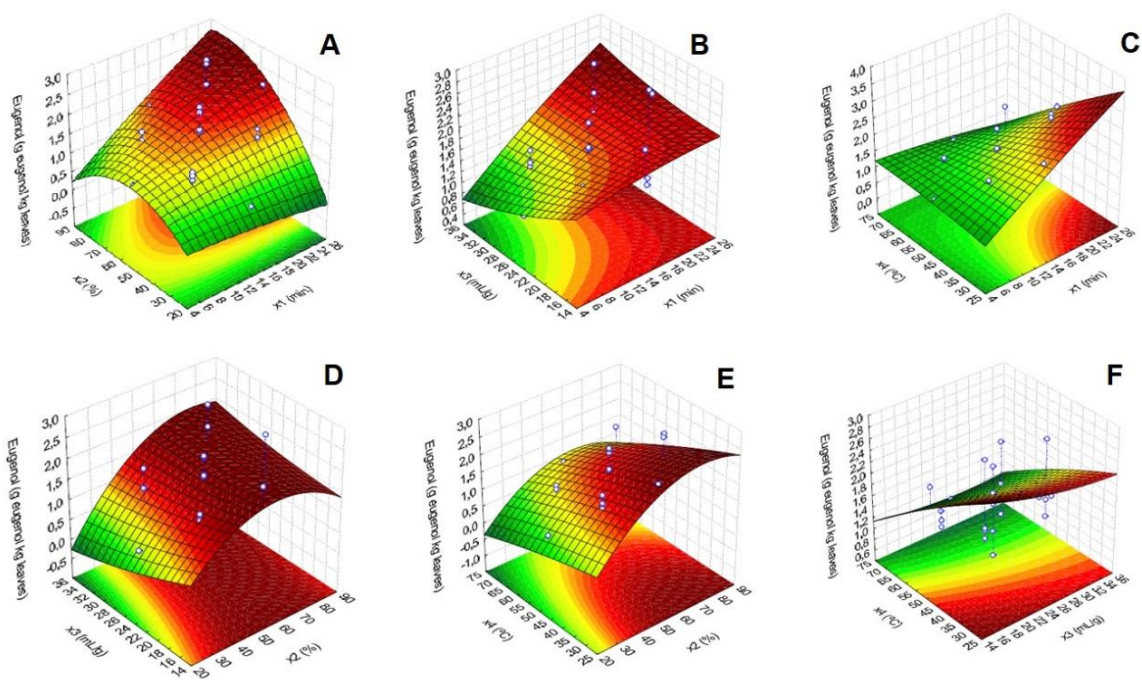
Frohlich *et al.* (2019) avaliaram a extração das folhas de cravo com CO<sub>2</sub> supercrítico (40 °C, 220 bar e 80 min) e um rendimento de até 3,22 g eugenol

por kg folhas na melhor condição experimental. Resultado este, que evidencia o maior rendimento do extrato das folhas de cravo quando obtido por UAE, uma vez que, favorece maior rendimento de eugenol em menor tempo de extração. Os resultados encontrados por Yun *et al.* (2010) no extrato etanólico dos botões, extraído por método convencional, Soxhlet, dentre os solventes testados, o etanol foi o que rendeu maior quantidade de eugenol (0,0964 g eugenol kg folhas), rendimento este menor do obtido no presente estudo. Para INAM; DEO; NARKHEDE (2014) a concentração encontrada de eugenol no extrato metanólico de cravo, por Soxhlet, foi de 21,91  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Bhuiyan *et al.* (2010), confirmam o eugenol como composto majoritário dos óleos de folha de cravo, o qual encontraram um teor de 74,28% de eugenol. Outros estudos (RAINA *et al.*, 2001; SRIVASTAVA; SRIVASTAVA; SYAMSUNDAR, 2005) também relatam grande quantidade de eugenol nos óleos de folhas de cravo, 70%, 94,4%, 66%-77%, respectivamente. Alexandru *et al.* (2013) ao estudar sobre a extração dos botões de cravo obtidos pela extração assistida por ultrassom (em batelada e com fluxo contínuo) e por maceração confirmou a presença do composto eugenol na composição dos extratos em ambos os métodos.

A alta concentração de eugenol no óleo de folhas e botões o torna de grande potencial para uso medicinal, por apresentarem inúmeras propriedades biológicas, tais como: poder ativo contra bactérias patogênicas (CHAIEB *et al.*, 2007), antifúngica e anti-inflamatório (RANA; KASHMIRI; AHMAD, 2010). Além disso, há relatos de serem utilizados, na medicina popular nos efeitos terapêuticos, antiemético, analgésico, antiespasmótico e antisséptico (HUANG *et al.*, 2002; SHAFI *et al.*, 2002; VELLUTI *et al.*, 2003). Ainda, tem sido empregado na produção de outros compostos fenólicos, como por exemplo, a vanilina, e na parte odontológica como anestésico oral (PRIEFERT; RABENHORST; STEINBÜCHEL, 2001).

A Figura 5.2, mostra gráficos de superfícies que descrevem o efeito do tempo, amplitude, temperatura e razão massa/solvente do rendimento de eugenol.



**Figura 5.2.** Superfície de respostas para rendimento de eugenol. **A:** Variáveis: x1 (tempo) e x2 (amplitude) e constante x3 (25 mL g<sup>-1</sup>) e x4 (50 °C). **B:** Variáveis: x1 (tempo) e x3 (solvente/amostra) e constante x2 (55%) e x4 (50 °C). **C:** Variáveis: x1 (tempo) e x4 (temperatura) e constante x3 (25 mL g<sup>-1</sup>) e x2 (55%). **D:** Variáveis: x2 (amplitude) e x3 (solvente/amostra) e constante x1 (15 min) e x4 (50 °C). **E:** Variáveis: x2 (amplitude) e x4 (temperatura) e constante x3 (25 mL g<sup>-1</sup>) e x1 (15 min). **F:** x3 (solvente/amostra) e x4 (temperatura) e constante x1 (15 min) e x2 (55%).

Conforme Figura 5.2, verifica-se que o rendimento de eugenol aumentou em amplitudes e tempo maiores de extração. No entanto, para as variáveis independentes razão solvente/amostra e temperatura, verifica-se efeito negativo sobre o rendimento de eugenol. De acordo com Purohit e Gogate (2015), os valores maiores obtidos em maiores amplitudes, podem ser em decorrência dos efeitos de cavitação que aumentam em relação ao número de cavidades e maiores colapsos dessas em níveis altos de dissipação de energia, permitindo aumento na destruição da matriz da planta, logo, maior facilidade de extração do composto de interesse.

Portanto, verifica-se que os maiores rendimentos de extrato (20 min, 70%, 30 mL g<sup>-1</sup> e 60 °C) e de eugenol (20 min, 70%, 20 mL g<sup>-1</sup> e 40 °C) foram obtidos nas mesmas condições de amplitude e tempo de extração, alterando as demais variáveis (razão solvente/amostra e temperatura). Com isso, conclui-se que o eugenol mostra boa solubilidade ao solvente etanol utilizado nas extrações e, a



variação de temperatura favoreceu a extração de outros compostos menos solúveis.

#### 5.2.2.4 Teor de compostos fenólicos (TCF) e atividade antioxidante (DPPH e FRAP)

Um antioxidante pode ser definido como qualquer substância em que, quando presente em baixas concentrações em comparação com o substrato oxidável, retarda ou inibe consideravelmente a oxidação desse substrato (SIES; STAHL; SUNDQUIST, 1992). Desse modo, o interesse por antioxidantes naturais para utilização principalmente em alimentos teve um aumento significativo, além disso, há maior preferência dos consumidores por alimentos com aditivos naturais (ABDALLA *et al.*, 2007; MAHINDRAKAR; RATHOD, 2020; SALEHI *et al.*, 2005).

Diante dos resultados apresentados na Tabela 5.6, observa-se que todas as amostras apresentaram poder antioxidante quando submetidas pela técnica assistida por ultrassom.

Os valores encontrados de DPPH, apresentaram uma variação de 1,56 a 1,96 ug Trolox mg<sup>-1</sup>, no entanto, sem diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) nos valores dentre as condições experimentais realizadas, diferentemente dos resultados obtidos com o método FRAP ( $5,74 \pm 0,13$  a  $8,61 \pm 0,08$   $\mu\text{mol Fe}^{2+}$  mg<sup>-1</sup>) e de teor de compostos fenólicos ( $285,47 \pm 5,75$  a  $387,86 \pm 11,20$  ug EAG mg<sup>-1</sup>).

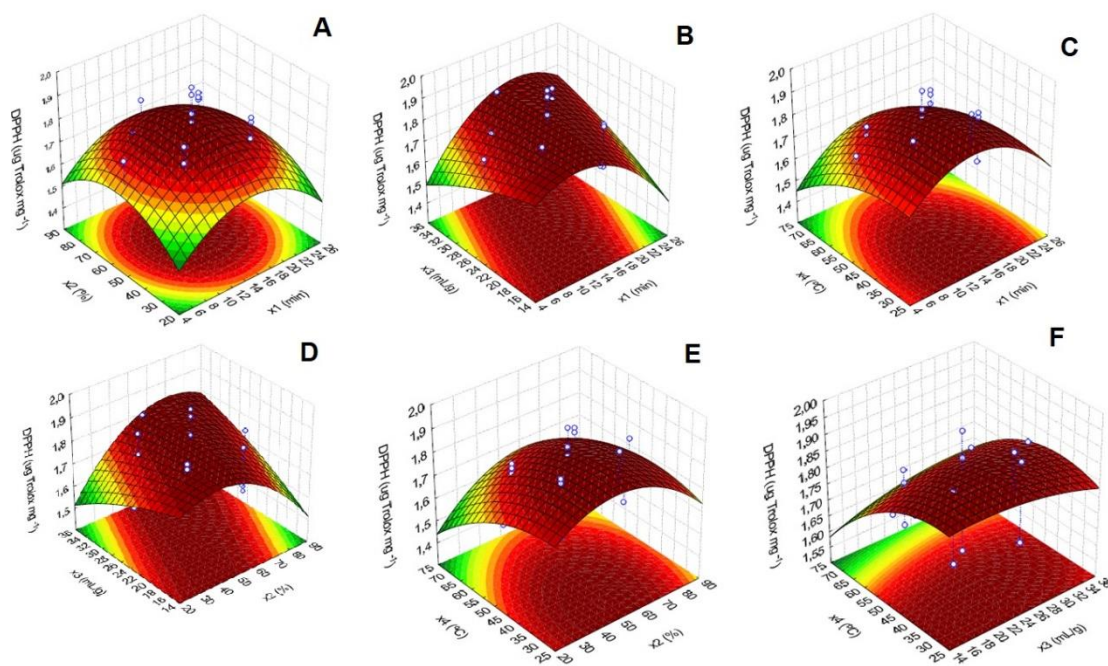
**Tabela 5.6.** Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos das folhas de crav da índia extraídos por ultrassom e maceração com etanol.

Experimentos	X <sub>1</sub> (min)	X <sub>2</sub> (%)	X <sub>3</sub> (mL/g)	X <sub>4</sub> (°C)	TCF (ug EAG mg <sup>-1</sup> )	DPPH (μmol Trolox mg <sup>-1</sup> )	FRAP (μmol <sub>Fe2+</sub> mg <sup>-1</sup> )
1	15	55	25	30	374,24 ± 2,96 <sup>e, f, g</sup>	1,96 ± 0,07 <sup>a</sup>	7,27 ± 0,36 <sup>h</sup>
2	10	40	20	40	359,13 ± 11,80 <sup>c, d, e, f, g</sup>	1,84 ± 0,13 <sup>a</sup>	5,87 ± 0,16 <sup>a, b, c</sup>
3	20	40	20	40	379,86 ± 7,47 <sup>f, g</sup>	1,82 ± 0,13 <sup>a</sup>	7,31 ± 0,07 <sup>h</sup>
4	10	70	20	40	361,12 ± 6,97 <sup>c, d, e, f, g</sup>	1,75 ± 0,09 <sup>a</sup>	6,43 ± 0,09 <sup>b, c, d, e, f, g</sup>
5	20	70	20	40	323,89 ± 11,80 <sup>b, c, d, e, f</sup>	1,62 ± 0,08 <sup>a</sup>	5,98 ± 0,04 <sup>a, b, c, d</sup>
6	10	40	30	40	340,43 ± 12,65 <sup>b, c, d, e</sup>	1,59 ± 0,27 <sup>a</sup>	6,44 ± 0,22 <sup>b, c, d, e, f, g</sup>
7	20	40	30	40	359,05 ± 12,41 <sup>c, d, e, f, g</sup>	1,84 ± 0,09 <sup>a</sup>	6,84 ± 0,20 <sup>e, f, g, h</sup>
8	10	70	30	40	336,37 ± 7,06 <sup>b, c, d, e</sup>	1,75 ± 0,11 <sup>a</sup>	5,99 ± 0,68 <sup>a, b, c, d</sup>
9	20	70	30	40	340,07 ± 12,75 <sup>b, c, d, e</sup>	1,78 ± 0,10 <sup>a</sup>	6,80 ± 0,32 <sup>d, e, f, g, h</sup>
10	10	40	20	60	342,73 ± 11,87 <sup>b, c, d, e, f</sup>	1,77 ± 0,15 <sup>a</sup>	6,79 ± 0,14 <sup>d, f, g, h</sup>
11	20	40	20	60	329,60 ± 10,03 <sup>b, c, d</sup>	1,70 ± 0,15 <sup>a</sup>	7,30 ± 0,31 <sup>h</sup>
12	10	70	20	60	339,54 ± 8,44 <sup>b, c, d, e</sup>	1,64 ± 0,19 <sup>a</sup>	6,85 ± 0,60 <sup>e, f, g, h</sup>
13	20	70	20	60	387,86 ± 11,20 <sup>g</sup>	1,81 ± 0,11 <sup>a</sup>	6,87 ± 0,11 <sup>f, g, h</sup>
14	10	40	30	60	311,05 ± 11,82 <sup>a, b</sup>	1,73 ± 0,11 <sup>a</sup>	7,10 ± 0,04 <sup>g, h</sup>
15	20	40	30	60	348,79 ± 8,44 <sup>b, c, d, e, f</sup>	1,75 ± 0,08 <sup>a</sup>	5,74 ± 0,13 <sup>a, b</sup>
16	10	70	30	60	326,25 ± 14,66 <sup>b, c</sup>	1,69 ± 0,14 <sup>a</sup>	6,28 ± 0,31 <sup>a, b, c, d, e, f</sup>
17	20	70	30	60	339,63 ± 14,06 <sup>b, c, d, e</sup>	1,79 ± 0,12 <sup>a</sup>	6,98 ± 0,17 <sup>f, g, h</sup>
18	15	55	25	70	319,21 ± 18,21 <sup>a, b</sup>	1,57 ± 0,05 <sup>a</sup>	6,23 ± 0,04 <sup>a, b, c, d, e, f</sup>
19	5	55	25	50	359,97 ± 5,75 <sup>c, d, e, f, g</sup>	1,77 ± 0,20 <sup>a</sup>	6,97 ± 0,29 <sup>f, g, h</sup>
20	25	55	25	50	285,47 ± 5,75 <sup>a</sup>	1,56 ± 0,10 <sup>a</sup>	6,42 ± 0,28 <sup>b, c, d, e, f, g</sup>
21	15	25	25	50	331,88 ± 11,25 <sup>b, c, d</sup>	1,64 ± 0,11 <sup>a</sup>	7,27 ± 0,09 <sup>h</sup>
22	15	85	25	50	367,59 ± 17,35 <sup>d, e, f, g</sup>	1,77 ± 0,27 <sup>a</sup>	8,61 ± 0,08 <sup>i</sup>
23	15	55	15	50	358,00 ± 11,23 <sup>c, d, e, f, g</sup>	1,77 ± 0,14 <sup>a</sup>	7,36 ± 0,17 <sup>h</sup>
24	15	55	35	50	317,94 ± 7,72 <sup>a, b</sup>	1,96 ± 0,07 <sup>a</sup>	6,60 ± 0,10 <sup>c, d, e, f, g, h</sup>
25	15	55	25	50	347,54 ± 10,28 <sup>b, c, d, e, f</sup>	1,84 ± 0,13 <sup>a</sup>	6,05 ± 0,19 <sup>a, b, c, d, e</sup>
Maceração					341,62 ± 12,61 <sup>b, c, d, e</sup>	1,66 ± 0,08 <sup>a</sup>	5,57 ± 0,06 <sup>a</sup>

x1 – tempo; x2 – amplitude; x3- razão solvente/amostra; x4 – temperature.

Letras iguais na mesma coluna e para o mesmo método de extração indicam que não houve diferença significativa ao nível de 5%.

Na Figura 5.3, ilustra os efeitos interativos das variáveis frente ao potencial oxidativo por DPPH dos extratos das folhas de cravo dentro dos limites utilizados. Cada variável dependente, foi plotada em relação a duas variáveis independentes mantendo o valor fixo de duas outras variáveis no ponto central.



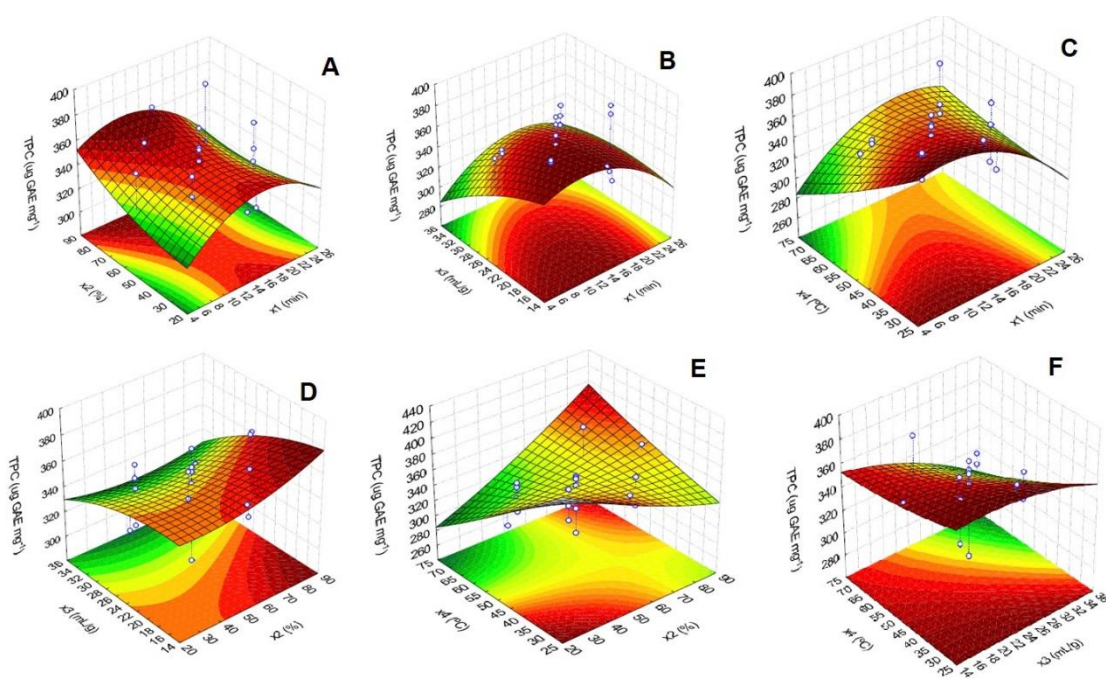
**Figura 5.3.** Superfície de Resposta para DPPH. A: Variáveis: x1 (tempo) e x2 (amplitude) e constante x3 (25 mL g<sup>-1</sup>) e x4 (50 °C). B: Variáveis: x1 (tempo) e x3 (solvente/amostra) e constante x2 (55%) e x4 (50 °C). C: Variáveis: x1 (tempo) e x4 (temperatura) e constante x3 (25 mL g<sup>-1</sup>) e x2 (55%). D: Variáveis: x2 (amplitude) e x3 (solvente/amostra) e constante x1 (15 min) e x4 (50 °C). E: Variáveis: x2 (amplitude) e x4 (temperatura) e constante x3 (25 mL g<sup>-1</sup>) e x1 (15 min). F: x3 (solvente/amostra) e x4 (temperatura) e constante x1 (15 min) e x2 (55%).

Para a técnica de extração de maceração os valores encontrados foram: para TCF:  $341,62 \pm 12,61$  ug EAG mg<sup>-1</sup>, DPPH:  $1,66 \pm 0,08$  13 ug Trolox mg<sup>-1</sup>, e FRAP:  $5,57 \pm 0,06$  µmol Fe<sup>2+</sup> mg<sup>-1</sup>. Comparando com os maiores valores obtidos pela extração por ultrassom de TCF e FRAP (experimentos 13 e 22) estes se mostraram respectivamente, aproximadamente 13% e 35% maiores.

Na literatura alguns trabalhos também avaliaram o poder antioxidante de extratos obtidos desta espécie. Baghshahi *et al.* (2014) no extrato etanólico de botão de cravos encontrou 5,9% e 13,1% de inibição dos radicais de DPPH, nas concentrações de 0,1 e 0,5 ug mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Radünz *et al.* (2019)

encontrou um conteúdo total de compostos fenólicos de 9,07 mg EAG g<sup>-1</sup>, no óleo de botão de cravo por hidrodestilação. El-Maati *et al.* (2016) obteve melhor quantidade de compostos fenólicos para o extrato etanólico (230 mg EAG g<sup>-1</sup>), com concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup> obtido de botões de cravo. Resultados estes, que se mostraram inferiores, aos valores encontrados no presente estudo.

Baseado na Tabela 5.6 e Figura 5.4, o efeito mais significativo sobre TCF foi razão solvente/massa seguido pela temperatura, ambos com poder linear negativo. Conforme na Figura 3, valores muito altos de razão massa/solvente e temperatura resultaram num baixo valor de TCF.

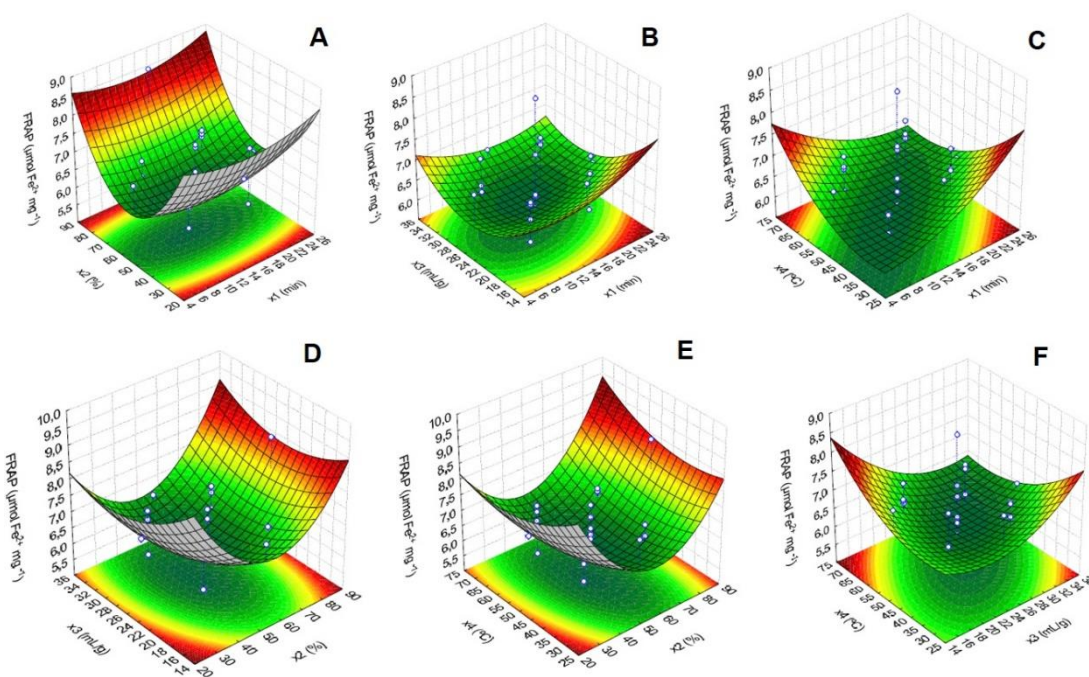


**Figura 5.4.** Superfície de Resposta para TCF. A: Variáveis: x1 (tempo) e x2 (amplitude) e constante x3 (25 mL g<sup>-1</sup>) e x4 (50 °C). B: Variáveis: x1 (tempo) e x3 (solvente/amostra) e constante x2 (55%) e x4 (50 °C). C: Variáveis: x1 (tempo) e x4 (temperatura) e constante x3 (25 mL g<sup>-1</sup>) e x2 (55%). D: Variáveis: x2 (amplitude) e x3 (solvente/amostra) e constante x1 (15 min) e x4 (50 °C). E: Variáveis: x2 (amplitude) e x4 (temperatura) e constante x3 (25 mL g<sup>-1</sup>) e x1 (15 min). F: x3 (solvente/amostra) e x4 (temperatura) e constante x1 (15 min) e x2 (55%).

Comportamento semelhante foi obtido por Andres *et al.* (2020), os quais relataram que com o aumento da razão sólido/líquido houve uma diminuição nos valores de TCF. Pompeu; Silva; Rogez (2009), observou que melhor transferência de massa foi obtida em uma razão sólido/líquido (1:2), no entanto, para razões maiores, não foi possível a extração de TCF. Ainda, segundo Palsikowski *et al.* (2020), os valores encontrados de TCF tiveram pequenos

aumentos a medida que aumentava a relação entre massa/solvente. O aumento da temperatura em processos de extração favorece a solubilidade dos compostos e os coeficientes de difusão do solvente, permitindo maior rendimento. Porém, em temperaturas muito elevadas pode favorecer reações de decomposição dos polifenóis, como oxidação, hidrólise, diminuindo assim a capacidade antioxidante do extrato (AJILA *et al.*, 2011). Dessa forma, o aumento da temperatura indica que há extração de mais compostos além, dos compostos com atividade antioxidante, uma vez que o rendimento aumenta com o aumento da temperatura.

Como ilustrado na Figura 5.5, um notável aumento sobre o valor de FRAP pôde ser observado quando a máxima amplitude foi atingida, decorrente de efeito significativo e positivo. Como já relatado anteriormente, o poder do ultrassom relativamente alto pode resultar na destruição das paredes celulares, aumentando a taxa de extração. Comportamento semelhante foi encontrado por Palsikowski *et al.* (2020).



**Figura 5.5.** Superfície de Resposta para FRAP. A: Variáveis: x1 (tempo) e x2 (amplitude) e constante x3 (25  $\text{mL g}^{-1}$ ) e x4 (50  $^{\circ}\text{C}$ ). B: Variáveis: x1 (tempo) e x3 (solvente/amostra) e constante x2 (55%) e x4 (50  $^{\circ}\text{C}$ ). C: Variáveis: x1 (tempo) e x4 (temperatura) e constante x3 (25  $\text{mL g}^{-1}$ ) e x2 (55%). D: Variáveis: x2 (amplitude) e x3 (solvente/amostra) e constante x1 (15 min) e x4 (50  $^{\circ}\text{C}$ ). E: Variáveis: x2 (amplitude) e x4 (temperatura) e constante x3 (25  $\text{mL g}^{-1}$ ) e x1 (15 min). F: x3 (solvente/amostra) e x4 (temperatura) e constante x1 (15 min) e x2 (55%).

A extração de compostos bioativos com poder antioxidante pelo método assistido por ultrassom, permite condições mais flexíveis que evitam a degradação de compostos essenciais, além de que essa técnica fornece um rendimento maior em menor tempo em comparação com o método convencional testado (maceração).

A atividade antioxidante dos extratos, pode estar relacionada com presença do composto eugenol, ou ainda, devido ao efeito sinérgico de outros possíveis compostos que possam estar presentes, os quais atuam como inibidores de radicais livres. Resultado semelhante foi relato por outros autores, que a presença de eugenol, permitiu poder antioxidante ao extrato (MAHAPATRA; ROY, 2014; MASTELIĆ *et al.*, 2008; OGATA *et al.*, 2000). Frohlich *et al.* (2019) confirmam o poder antioxidante do composto eugenol pelos métodos de teor de compostos fenólicos e DPPH (aonde o padrão de eugenol obteve  $645,32 \pm 11,41 \mu\text{g EAG mg}^{-1}$ ;  $27,18 \pm 1,32 \mu\text{mol}_{\text{Fe}^{2+}} \text{mg}^{-1}$ , respectivamente).

Portanto, em comparação com o método convencional de extração (maceração), o processo de extração assistida por ultrassom se mostrou o método mais eficiente de extração de antioxidantes dos extratos das folhas de cravo, uma vez que, mesmo apresentando atividades antioxidantes semelhantes a extração por ultrassom permite a redução no tempo final de extração.

Na Tabela 5.7 é apresentado os *p*-valores da análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos na matriz do *desing* do composto central para as variáveis TCF, DPPH e FRAP. Ao analisar a determinação dos coeficientes (valores  $R^2$ ), verifica-se baixos valores de  $R^2$  (variando de 0,4789 a 0,8758), logo, indicam uma baixa confiabilidade dos modelos. Por esta razão foi apresentada a tabela de Anova de forma completa somente para o rendimento de extrato, e para as demais respostas foram apresentados somente os *p*-valores.

**Tabela 5.7.** *p*-valores da análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos na matriz do desing do composto central para as variáveis TCF, DPPH e FRAP.

	TCF	DPPH	FRAP
Linear			
X <sub>1</sub>	0,2645	0,9211	0,4021
X <sub>2</sub>	0,2727	0,9435	0,2510
X <sub>3</sub>	0,0319	0,9435	0,0960
X <sub>4</sub>	0,0380	0,2907	0,8704
Interações			
X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub>	0,3582	0,9861	0,9155
X <sub>1</sub> .X <sub>3</sub>	0,2119	0,4711	0,3255
X <sub>1</sub> .X <sub>4</sub>	0,1169	0,8763	0,0900
X <sub>2</sub> .X <sub>3</sub>	0,6104	0,5063	0,2901
X <sub>2</sub> .X <sub>4</sub>	0,0447	0,7708	0,2231
X <sub>3</sub> .X <sub>4</sub>	0,4815	0,8494	0,1001
Quadrática			
x <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0,0799	0,3128	0,1941
x <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0,5053	0,4319	0,0107
x <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0,4257	0,8550	0,0666
x <sub>4</sub> <sup>2</sup>	0,7628	0,7070	0,1519
Falta de Ajuste	0,0810	0,6586	0,0596
Erro Puro			
Resíduo			
Modelo	0,6685	0,8967	0,8662
Total			
R <sup>2</sup>	0,4789	0,3648	0,4478
R <sup>2</sup> ajustado	0,0	0,0	0,0

<sup>1</sup> Graus de Liberdade; x<sub>1</sub> – tempo; x<sub>2</sub>- Amplitude; x<sub>3</sub>-Razão solvente/amostra; x<sub>4</sub>- Temperatura

### 5.2.3 Extração por Líquido Pressurizado

#### 5.2.3.1 Rendimento

Dentre os métodos de extração, o PLE tem se destacado devido ao uso de pequenas quantidades de solvente (Santos *et al.*, 2019). Neste estudo, a PLE foi utilizada como uma técnica alternativa para obtenção dos extratos de folhas de cravo. O etanol foi selecionado como solvente (sessão 5.2.1), uma vez que em estudos (OSÓRIO-TOBON *et al.*, 2013; KRZYCZKOWSKA e KOZŁOWSKA, 2017; SUGIHARTINI *et al.*, 2020) se mostrou mais favorável com base no rendimento quando comparado a outros solventes. Na Tabela 5.8 estão apresentados os dados de rendimentos, obtidos por PLE realizadas em diferentes temperaturas (40, 50 e 60 °C).

**Tabela 5.8.** Condições experimentais e rendimentos das extrações obtidos por PLE das folhas de cravo da Índia.

Método de extração	T <sup>1</sup> (°C)	P <sup>2</sup> (bar)	T <sup>3</sup> (min)	Rendimento (%)
	40			3,69
PLE	50	100	20	5,41 ± 0,11
	60			6,54

<sup>1</sup> Temperatura de extração; <sup>2</sup> Pressão de extração; <sup>3</sup> Tempo de extração.

Observa-se na Tabela 5.8 que o incremento da temperatura (40 a 60 °C) favoreceu o rendimento de extrato, aumentando de 3,69 para 6,54%. Esse aumento positivo, se dá em decorrência que o aumento da temperatura diminui a densidade e viscosidade do solvente. Em consequência, permite melhor penetração na amostra e a redução da tensão superficial solvente/matriz, permitindo que os analitos se dissolvam mais rapidamente no solvente e aumenta o coeficiente de difusão (OSÓRIO-TÓBON *et al.*, 2013) provendo taxas de extração mais rápidas ((MUSTAFA e TUNER, 2011). Além disso, o aumento da temperatura pode interromper as fortes interações soluto-matriz causadas pelas forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e atrações dipolares entre as moléculas do soluto e sítios ativos da matriz (FREITAS *et al.*, 2013; TRIPODO *et al.*, 2018).

O efeito positivo da temperatura se confirma por outros autores quando realizado a extração etanólica com líquido pressurizado de materiais vegetais (Rudke *et al.*, 2019), *Mauritia flexuosa* L., *Eremanthus erythropappus* (SANTOS *et al.*, 2019), *Monteverdia aquifolia* (ALVES *et al.*, 2022), *Cnidocolus quercifolius* (SANTOS *et al.*, 2020) e *Momordica charantia* (SYAHARIZA *et al.*, 2016).

No extrato etanólico das folhas de cravo, obtidos pelo método convencional de maceração (Sessão 5.2.2), encontrou-se um rendimento de 4,56%, em 20 min e 60 °C. Rendimento menor quando comparado aos extratos obtidos pelos extratos quando empregado por PLE (6,54%), submetido nas mesmas condições experimentais em 20 min e 60 °C. Na pesquisa de Fauzya *et al.* (2019) e Aisha *et al.* (2012) estes, avaliaram extratos das folhas de cravo por método convencional Soxhlet e encontraram um rendimento de 12,9% (após 72 horas com renovação do solvente etanol) e 12% com extração metanólica



respectivamente. Tamalia *et al.* (2012), investigaram a composição fenólica e a citotoxicidade contra células humanas de câncer de mama das folhas de oliveira por diferentes técnicas de extração. Observou-se que o emprego de PLE com etanol produziu maior rendimento (19,9%) para todas as variedades estudadas. Já para método assistido por ultrassom os rendimentos foram significativamente inferiores aos obtidos por PLE com etanol.

Contudo, as técnicas de extração convencionais como maceração e Soxhlet, possuem desvantagem como elevados tempo de extração para alcançar o rendimento desejável, além de grande demanda de solvente e degradação térmica devido ao alto tempo no processo (WANG e WELLER, 2006; KOTOVICZ *et al.*, 2014). Embora PLE, maceração e Soxhlet são procedimentos diferentes, com vantagens e desvantagens, a comparação é válida para auxiliar na seleção da extração de compostos de interesse. Além disso, vale ressaltar que a extração por Soxhlet requer um tempo (horas) superior de extração em comparação com PLE (minutos).

### 5.2.3.2 Rendimento de eugenol

A concentração de eugenol extraídos das folhas de cravo por PLE a 40, 50 e 60 °C foram determinados e os resultados se encontram na Tabela 5.9.

**Tabela 5.9.** Resultado do teor e rendimento de eugenol dos extratos das folhas de cravos extraídos por PLE com etanol.

Método de extração	T (°C) <sup>1</sup>	Eugenol (%) <sup>2</sup>	Eugenol (g eugenol kg folhas <sup>-1</sup> )
PLE	40	3,47 ± 0,02	1,28 ± 0,89 <sup>a</sup>
	50	3,94 ± 0,09	2,10 ± 0,78 <sup>b</sup>
	60	4,03 ± 0,04	2,66 ± 0,05 <sup>c</sup>

<sup>1</sup> Temperatura; <sup>2</sup> gramas de eugenol por 100g de extrato.

Letras iguais na mesma coluna e para o mesmo método de extração indicam que não houve diferença significativa ao nível de 5%.

A análise de Tukey 5%, mostrou diferença significativa na concentração desse fenilpropanóide quando analisados em diferentes temperaturas por PLE. Conforme verificado no extrato obtido a partir da extração por maceração das

folhas de cravo com etanol em 20 minutos, a concentração de eugenol foi de  $1,36 \pm 0,05$  g eugenol por kg folhas (Sessão 5.2.2.3). Concentração aproximadamente 2 vezes menor ao maior valor encontrado no presente estudo por PLE.

Na literatura encontra alguns trabalhos que relatam rendimentos de eugenol obtidos dos botões e das folhas de cravo por outros métodos de extração. Yun *et al.* (2010), encontraram 0,0964g eugenol por kg de botões quando submetidos por Soxhlet (5 horas) com etanol. Ainda, no presente estudo, quando avaliou-se extratos das folhas de cravo por ultrassom (etanol) (Sessão 5.2.2.3) encontrou-se um rendimento de 2,29 g eugenol kg folhas para esse fenilpropanóide, quando extraído na condição de 70% amplitude, razão solvente amostra de  $30 \text{ g mL}^{-1}$ , temperatura de  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  e 20 min. Rendimentos esses que foram inferiores aos valores relatados em PLE no presente estudo, sendo assim, o processo de extração por PLE se mostrou favorável para extração desse composto a partir das folhas de cravo.

### 5.2.3.3 Teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante (DPPH e FRAP)

O conteúdo total de compostos fenólicos é expresso em  $\mu\text{g}$  de equivalente de ácido gálico (EAG) por mg de extrato e variou de 203,13 a 217,49 (Tabela 5.10). Os resultados obtidos são correlacionais com uma curva padrão de ácido gálico ( $R^2 = 0,9971$ ).

**Tabela 5.10.** Valores de TPC, DPPH and FRAP dos extratos das folhas de cravo obtido por PLE.

Método extração	Experimento	T ( $^\circ\text{C}$ ) <sup>1</sup>	P (bar) <sup>2</sup>	T (min) <sup>3</sup>	TCF ( $\mu\text{g GAE mg}^{-1}$ )	DPPH ( $\mu\text{mol Trolox mg}^{-1}$ )	FRAP ( $\mu\text{mol}_{\text{Fe}^{2+}} \text{mg}^{-1}$ )
	1	40			$203,13 \pm 2,78^a$	$1,31 \pm 0,12^a$	$4,86 \pm 0,53^a$
PLE	2	50	100	20	$197,10 \pm 2,58^a$	$1,37 \pm 0,04^{a,b}$	$5,08 \pm 0,15^a$
	3	60			$217,49 \pm 4,25^b$	$1,60 \pm 0,01^b$	$6,20 \pm 0,19^b$

<sup>1</sup> Temperatura de extração; <sup>2</sup> Pressão de extração; <sup>3</sup> Tempo de extração.

Letras iguais na mesma coluna e para o mesmo método de extração indicam que não houve diferença significativa ao nível de 5%.

O maior teor de compostos fenólicos totais foi detectado na maior temperatura de extração (60 °C). O efeito favorável da temperatura sobre TPC é provavelmente devido ao aumento da solubilidade com o aumento da temperatura, devido à maior agitação molecular do solvente (RUDKE *et al.*, 2019).

A influência positiva da temperatura de extração nos valores de TPC foi também detectado em outros trabalhos que aplicaram PLE: nas partes aéreas de *Dracocephalum kotschy* (KAMALIA *et al.*, 2016), na raiz de *Scutellaria pinnatifida* (GOLMAKANI *et al.*, 2014), nas folhas de chá verde (BERMEJO *et al.*, 2015), em extratos de casca de jabuticaba (SANTOS *et al.*, 2012).

O TPC encontrado para os extratos obtidos por PLE (119 a 142,55 µg GAE mg extrato) foram inferiores dos extratos obtidos por ultrassom (285,47 ± 5,75 a 387,86 ± 11,20 µg GAE mg<sup>-1</sup>) e aos extratos obtidos pelo método de maceração (TPC 341,62 ± 12,61 µg GAE mg<sup>-1</sup>) (Sessão 5.2.2.4), ambos os métodos com solvente etanol. A Myrtaceae representa uma família de plantas com várias espécies com importantes virtudes medicinais. Ranghoo-Sanmukhiya *et al.* (2019), analisaram a bioquímica e filogenética de quatro espécies de *Syzygium aromaticum*. Em estudo, os autores encontraram valores de TPC de 4,29 ± 0,31 a 8,18 ± 0,39 mg GAE g<sup>-1</sup> nos extratos metanólicos, valores que foram menores ao encontrados no presente estudo. Este comportamento deve-se à diferença no método de extração e na matéria-prima.

Conforme resultados descritos na Tabela 5.10, todas as amostras apresentam capacidade antioxidante. Os valores variaram de 1,31 a 1,60 µmol Trolox mg<sup>-1</sup> para DPPH e de 4,89 a 6,20 µmol<sub>Fe2+</sub> mg<sup>-1</sup>, quando analisados pelo método FRAP. Em ambos os métodos empregados, apresentaram diferença significativa (p < 0,05) apenas quando submetido na maior temperatura experimental, à 60 °C.

Os resultados obtidos da capacidade antioxidante, sugerem uma relação com concentração de compostos fenólicos, uma vez, os maiores valores encontrados para DPPH e FRAP, 1,60 ± 0,01 µmol Trolox mg<sup>-1</sup> e 6,20 ± 0,19 µmol Fe<sup>2+</sup> mg<sup>-1</sup> respectivamente, foram determinados nos extratos com maior TPC, extraídos a 60 °C. Ajila *et al.* (2011), afirma que o emprego da variável temperatura nos processos de extração contribui para solubilidade dos

compostos e com coeficiente de difusão do solvente, promovendo rendimentos maiores de compostos.

Frohlich *et al.* (2019) encontram um alto teor de compostos fenólicos (645,32 µg GAE mg<sup>-1</sup>) e elevada capacidade antioxidante quando testadas pelos métodos DPPH IC<sub>50</sub> (129,69 µg mL<sup>-1</sup>) e FRAP (27,18 µmol Fe<sup>2+</sup> mg<sup>-1</sup>) para o eugenol puro. Diante disso, sugere-se que a capacidade antioxidante dos extratos obtidos no presente estudo, está relacionado com a concentração deste composto, uma vez que, nos extratos com maior concentração de eugenol (à 60°C) também apresentou maior capacidade antioxidante e concentração de compostos fenólicos.

## 5.2.4 Extração com CO<sub>2</sub> Supercrítico

### 5.2.4.1 Rendimento

Neste estudo, foram investigados os efeitos da pressão e temperatura do CO<sub>2</sub> na extração das folhas de cravo por SFE e, os resultados dos rendimentos total de extrato e os valores de solubilidade aparente, determinados a partir da parte inicial da curva de extração, são mostrados na Tabela 5.11.

**Tabela 5.11.** Condições experimentais e rendimentos obtidos pela extração com CO<sub>2</sub> supercrítico.

Metodo de extração	Experimento	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Rendimento (%) <sup>a</sup>	Densidade de CO <sub>2</sub> (g/cm <sup>3</sup> ) <sup>b</sup>	Solubilidade aparente g extrato/ g CO <sub>2</sub>
Extração com Fluido Supercrítico (SFE)	1	200	40	0,81	0,8398	0,0012
	2	200	60	0,70	0,7237	0,0009
	3	250	50	1,23 ± 0,09	0,8342	0,0014
	4	300	40	1,33	0,9099	0,0018
	5	300	60	1,94	0,8297	0,0026

<sup>a</sup>Valor médio ± desvio padrão de três repetições.

<sup>b</sup> NIST – National Institute of Standards and Technology.

Nota-se que o rendimento aumentou com o aumento da pressão (experimentos 1-4 e 2-5), mostrando um efeito positivo e significativo no rendimento a nível de 5% de significância. Isso, ocorre por que a densidade do

fluido supercrítico aumenta com o aumento da pressão de extração. Esse efeito é reforçado quando se analisam os experimentos realizados a 200 bar (experimentos 1 e 2), nos quais, um aumento de 20 °C na temperatura de extração, com conseqüente redução da densidade do solvente, resultou em uma redução do rendimento final, rendimento de 0,81% a 0,70%.

No entanto, a densidade do fluido supercrítico e a pressão de vapor do soluto determinam o rendimento de massa final do processo de extração (BRUNNER, 1994); sendo o máximo rendimento (1,94%) obtido na maior pressão e temperatura experimentais realizadas (300 bar/60 °C, experimento 5). Este fenômeno foi verificado em experimentos realizados na pressão máxima de 300 bar (experimentos 4 e 5). O aumento na temperatura de extração de 20 °C, embora a densidade diminuiu de 0,9099 para 0,8297 g cm<sup>-3</sup>, o rendimento aumentou de 1,33 para 1,94%. Assim, o efeito da densidade, predominou da solubilidade do soluto (e no rendimento final) na pressão mais baixa de 200 bar, enquanto na pressão mais alta o aumento da pressão de vapor com o aumento da temperatura foi mais significativo.

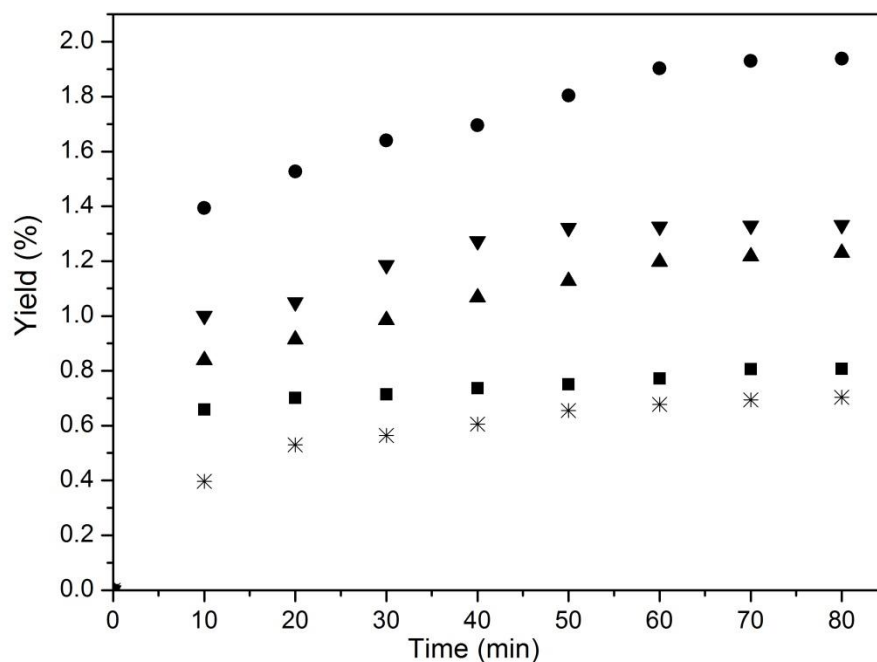
O elevado rendimento obtido pela extração supercrítica é devido a fácil liberação de soluto da matriz do vegetal em menor tempo de extração. Percebe-se que aumentando a temperatura de extração, em um alta pressão (experimento 4 e 5) aumenta a volatilidade do soluto e sua solubilidade (0,0018 para 0,0026 g extrato/ g CO<sub>2</sub>), possibilitando maior eficiência de extração (LEILA *et al.*, 2022). A influência da pressão, tem um efeito positivo no rendimento dos extratos de folha de cravo, de modo que o rendimento atinge seu máximo em altas pressões. Conforme pode verificar nos experimentos 1 e 5 o aumento das pressões no processo SFE (40 a 60 °C), manifesta-se, um aumento na solubilidade aparente do soluto em CO<sub>2</sub> supercrítico (de 0,0012 para 0,0026 g extrato/ g CO<sub>2</sub>), uma vez que melhora a força condução e conseqüentemente aumenta a taxa de extração (JIRARATTANARANGSRI; MUANGRAT, 2022).

Resultado semelhante é encontrado por Oliveira *et al.* (2016) o qual, analisou os rendimentos de extrato de cravo comercial, obtido pela extração com CO<sub>2</sub> supercrítico, onde, a pressão foi um fator positivo. Frohlich *et al.* (2019) teve comportamento semelhante nas variáveis aplicadas pelo mesmo método de extração (SFE) das folhas de cravo. Neste caso, foi investigado uma faixa de pressão de 150 a 220 bar, sendo que, o rendimento encontrado variou entre 0,74

a 1,08%. Rendimentos, que se mostrou 2 vezes menores aos obtidos no presente estudo. Sendo assim, a extração supercrítica das folhas de cravo em pressões elevadas (acima de 200 bar) se mostra vantajosa para o rendimento global do extrato.

Ademais, nota-se que quando as extrações foram submetidas a uma vazão mássica de solvente maior do que a utilizada por Frohlich *et al.* (2019), o rendimento da extração aumentou. Frohlich *et al.* (2019), realizaram a extração com CO<sub>2</sub> supercrítico a uma vazão mássica de 2 g mL<sup>-1</sup>, com rendimento máximo obtido de 1,08% em 220 bar. O presente estudo ao aplicar uma vazão de 5 g mL<sup>-1</sup> e 300 bar, encontrou um rendimento aproximadamente 2 vezes maior. Fato este, justifica-se, pois, o aumento na vazão mássica, aumenta a velocidade do solvente, que conseqüentemente diminui a espessura do filme externo em torno das partículas, o qual, é uma resistência à transferência de massa e, pelo aumento do gradiente de concentração entre o sólido e o solvente, uma vez que, há uma maior quantidade de solvente percorrendo o extrator por intervalo de tempo, permite um aumento na quantidade de extrato no fim do processo (SPRICIGO *et al.*, 2001).

As curvas cinéticas experimentais de extração do extrato de folha de cravo com CO<sub>2</sub> supercrítico em diferentes condições de temperatura e pressão são apresentadas na Figura 5.6.



**Figura 5.6.** Curva cinética experimental dos extratos das folhas de cravo obtidos pela extração supercrítica com CO<sub>2</sub>: ■ (200 bar, 40 °C); \* (200 bar, 60 °C); ▲ (250 bar, 50 °C); ▼ (300 bar, 40 °C); ● (300 bar, 60 °C).

Em geral, foram observados os três estágios característicos das curvas de SFE. A convecção é o mecanismo de transferência de massa envolvido na obtenção do extrato de fácil acesso, enquanto a difusão ocorre intrapartícula na extração do soluto de células intactas (SANTOS *et al.*, 2020). As curvas foram inicialmente constituídas pelo período de taxa de extração constante (CER), no qual o soluto de fácil acesso é rapidamente extraído por transferência de massa convectiva, depois pelo período de taxa de extração decrescente (FER), no qual a convecção e a difusão são importantes mecanismos de transferência. O terceiro estágio é a difusão controlada (DC), pois apenas o soluto nas células intactas está disponível para extração e, isso ocorre em baixa taxa de extração.

#### 5.2.4.2 Rendimento de eugenol

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi empregada para quantificação do composto eugenol nas amostras extraídas das folhas de cravo

obtidas por SFE. Empregou-se uma curva de calibração com o padrão do composto e os resultados foram expressos em termos de rendimento de eugenol (g de eugenol por kg de folhas), conforme descrito na Tabela 5.12.

**Tabela 5.12.** Compostos eugenol encontrado nos extratos de cravo da Índia obtido por CO<sub>2</sub> supercrítico em diferentes condições experimentais.

Solvente	T (°C) <sup>a</sup>	P (bar) <sup>b</sup>	Eugenol (%) <sup>c</sup>	Eugenol (g/ kg folhas)
CO <sub>2</sub>	40	200	35,44 ± 0,89 <sup>b</sup>	2,87 ± 0,072 <sup>a</sup>
	60	200	40,33 ± 0,78 <sup>c</sup>	2,82 ± 0,054 <sup>a</sup>
	50	250	27,67 ± 0,05 <sup>a</sup>	3,48 ± 0,007 <sup>b</sup>
	40	300	49,01 ± 0,74 <sup>d</sup>	6,52 ± 0,098 <sup>c</sup>
	60	300	41,73 ± 0,13 <sup>c</sup>	8,06 ± 0,025 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Temperatura de extração; <sup>b</sup> Pressão de extração; <sup>c</sup> gramas de eugenol por 100g de extrato.

Mesma letra na mesma coluna e para o mesmo solvente não indica diferença significativa com nível de confiança de 5%.

A maior concentração de eugenol nos extratos obtidos com CO<sub>2</sub> supercrítico, 49,01 %, foi obtida na condição de maior pressão e menor temperatura do planejamento (300 bar e 40°C), embora, na condição de maior temperatura (300 bar e 60 °C), pode-se verificar maior rendimento de eugenol, 8,06 ± 0,025, g de eugenol para cada kg de folhas, condição que também apresentou maior rendimento de extrato (1,94 %). Já em relação a menor concentração de eugenol, 27,67 %, esta, foi encontrada no extrato obtido a 250 bar e 50 °C, porém, o menor rendimento de composto, foi observado, na condição de extração de menor pressão e temperatura planejamento (200 bar e 40 °C).

O extrato de folha de cravo contém vários compostos, como flavonoides, triterpenoides, fenólicos e taninos (FAKER *et al.*, 2022). Frohlich *et al.* (2019) analisaram a composição química do extrato de folha de cravo obtido por extração supercrítica com CO<sub>2</sub> a 185 bar e 50 °C. Os principais componentes identificados foram eugenol (29,73%), chavicol (13,31%), n-pentacosano (11,66%) e hexacosanal (11,37%). Os principais compostos encontrados em extratos SFE de botões de cravo por outros autores foram eugenol (55-57%), β-cariofileno (7-15%), α-humuleno (1-2%) e eugenil acetato (12-22%) (GUAN *et*



*al.*, 2001; YANG *et al.*, 2014; HATAMI *et al.*, 2019). De acordo com outros estudos sobre a extração supercrítica de óleo de botões de cravo, a composição qualitativa dos extratos não mudou mesmo com variações na pressão e temperatura de extração (GUAN *et al.*, 2001; YAZDANI *et al.*, 2005).

Eugenol é o principal composto do cravo, podendo ser encontrado nas folhas e nos botões. Frohlich *et al.* (2019), ao avaliar a extração supercrítica das folhas de cravo verificaram maior concentração de eugenol (29,84%) em 220 bar e 40 °C. Mesma condição que apresentou maior quantidade em rendimento de eugenol (3,22 g eugenol kg folhas<sup>-1</sup>). No presente estudo, a 300 bar, é possível obter 2,5 vezes maior o rendimento de eugenol das folhas de cravo (8,06 eugenol kg folhas<sup>-1</sup>). Dessa forma, nota-se que pressões mais altas são mais favoráveis para extração desse fenilpropanóide.

#### 5.2.4.3 Teor de compostos fenólicos e capacidade antioxidante (DPPH e FRAP)

A Tabela 5.13 mostra o teor de compostos fenólicos das folhas de cravo após extração supercrítica. O maior valor encontrado foi de 373,45 µg GAE mg<sup>-1</sup> quando submetido a 250 bar e 50 °C. Já o menor valor de 206,40 µg GAE mg<sup>-1</sup> foi obtido em 300 bar e 40 °C.

**Tabela 5.13.** Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (DPPH e FRAP) dos extratos das folhas de cravo obtidos por CO<sub>2</sub> supercrítico.

Experimentos	Condições de Extração CO <sub>2</sub> Supercrítico	TCF (µg GAE mg <sup>-1</sup> )	DPPH (µmol Trolox mg <sup>-1</sup> )	FRAP (µmol Fe <sup>2+</sup> mg <sup>-1</sup> )
1	200 bar e 40 °C	224,44 ± 4,07 <sup>a,b</sup>	2,53 ± 0,01 <sup>a</sup>	10,88 ± 0,48 <sup>a</sup>
2	200 bar e 60 °C	250,64 ± 12,32 <sup>b</sup>	265 ± 0,06 <sup>a, b</sup>	12,87 ± 0,15 <sup>b</sup>
3	250 bar e 50 °C	373,45 ± 14,51 <sup>d</sup>	3,05 ± 0,04 <sup>b</sup>	17,77 ± 0,03 <sup>c</sup>
4	300 bar e 40 °C	206,20 ± 10,26 <sup>a</sup>	2,52 ± 0,30 <sup>a</sup>	10,54 ± 0,41 <sup>a</sup>
5	300 bar e 60 °C	316,74 ± 0,29 <sup>c</sup>	3,02 ± 0,05 <sup>b</sup>	17,79 ± 0,24 <sup>c</sup>

Letras iguais na mesma coluna e para o mesmo método de extração indicam que não houve diferença significativa ao nível de 5%.

Para melhor confiabilidade dos dados é necessário mais do que um tipo de ensaio da capacidade antioxidante, a fim de considerar os possíveis modos ação de um antioxidante (PRIOR; CAO, 1999; HUANG; OU, 2005). Dessa forma,

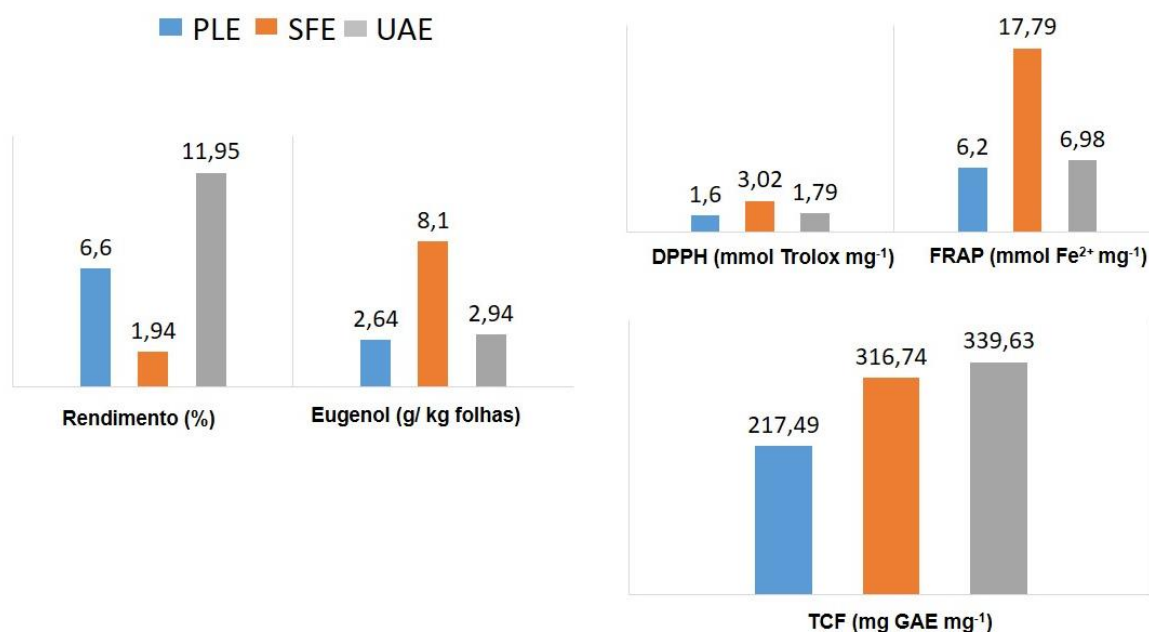
a capacidade antioxidante dos extratos foi avaliada pelo método de sequestro dos radicais livres DPPH e, pelo poder redutor do ferro (FRAP). Os valores encontrados variaram de 2,52 a 3,05  $\mu\text{mol Trolox mg}^{-1}$  e 10,54 a 17,79  $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{mg}^{-1}$ , para DPPH e FRAP, respectivamente. Em ambos os métodos testados nota-se que a maior atividade foi encontrada nas maiores temperaturas e pressão de extração, sendo  $17,79 \pm 0,24 \mu\text{mol Fe}^{2+} \text{mg}^{-1}$  e  $3,05 \pm 0,04 \mu\text{mol Trolox mg}^{-1}$ . Condições estas que também apresentaram maior quantidade de compostos fenólicos (Experimentos 3 e 5). Em geral, observa-se correlações positivas entre atividade antioxidante e os compostos fenolicos (TAGLIAZUCCHI *et al.*, 2010; BURIN *et al.*, 2014). É difícil atribuir a atividade antioxidante de misturas naturais e complexas como a de extratos a um determinado constituinte, no entanto, acredita-se que a atividade desses extratos está relacionada com a presença de uma alta concentração (42%) de eugenol (FROHLICH *et al.*, 2022). Além disso, esse fenilpropanóide, atua como quelante de íon ferrico, resultando na prevenção de formação dos radicais hidroxila, apresentando forte ação antioxidante (CHAIEB *et al.*, 2007).

Dentre os resultados, pode-se observar que em temperaturas de extração mais alta aumentou a extração de compostos fenólicos. Frohlich *et al.* (2019) encontraram uma variação de TPC no extrato das folhas de cravo obtido por  $\text{CO}_2$  supercrítico de 193,77 a 324,37  $\mu\text{g GAE mg}^{-1}$ , quando submetidos a pressões de 150 a 220 bar e temperaturas de 40 a 60  $^{\circ}\text{C}$ , valores que se mostraram inferiores em comparação ao estudo atual quando realizado em pressões superiores. Outro fator positivo do presente estudo, quando submetido sob pressões maiores (superior a 200 bar), foi em relação a capacidade antioxidante, onde para o método FRAP, apresentou uma concentração de 1,5 vezes maior em relação a melhor condição experimental, em comparação com o estudo mencionado anteriormente (FROHLICH *et al.*, 2019).

### **5.3 Comparação entre as técnicas de $\text{CO}_2$ supercrítico, PLE e UAE.**

A Figura 5.7 resume os melhores resultados obtidos com cada um dos métodos empregados (extração supercrítica, com líquido pressurizado e assistida por ultrassom). Nas condições testadas neste trabalho, a fração mais rica em eugenol, foi obtida pelo método de extração com  $\text{CO}_2$  supercrítico em

300 bar e 60 °C, com rendimento total de 1,94%, obteve-se 41,73% de eugenol e rendimento de eugenol de 8,06 g eugenol por kg folhas.



**Figura 5.7.** Comparação entre a atividade antioxidante (DPPH e FRAP), Teor de compostos fenólicos (TCF) e rendimento total e de eugenol dos extratos das folhas de cravo da índia obtidos por CO<sub>2</sub> supercrítico (SFE) (300 bar, 60 °C, 80 min), líquido pressurizado (PLE) com etanol (60 °C, 20 min) e assistida por ultrassom (UAE) (20 min, 70 %, 30 mL g<sup>-1</sup>, 60 °C).

Nos processos por líquido pressurizado e UAE à 60 °C, foram obtidos extratos com maior rendimento total (6,54% e 11,95%) e, um rendimento de eugenol de 2,64 e 2,94 g eugenol por kg folhas, respectivamente. Os extratos obtidos por PLE apresentaram menor poder antioxidante quando comparado com o extrato obtido por SFE e UAE para ambos os métodos testados. Além disso, apresentaram menor concentração de compostos fenólicos. Neste trabalho, dentre as três técnicas aplicadas, evidenciou que uma condição importante para se obter um extrato com maior rendimento total e, extraídos com alto rendimento de eugenol das folhas de cravo, é quando o processo de extração é submetido 60 °C.

Em geral, pode-se confirmar que as técnicas de extração e condições de operação estudadas no presente estudo, influenciaram substancialmente a composição dos extratos. Uma vez que, o composto de interesse, eugenol, foi encontrado em maior concentração nos extratos obtidos por CO<sub>2</sub> supercrítico. No entanto, embora os extratos de PLE e UAE tenham exibido menores concentrações do fenilpropanóide nos resultados globais, em termos de rendimento de eugenol, capacidade antioxidantes e compostos fenólicos totais, os resultados foram bastante satisfatórios.

SFE, PLE e UAE mostraram-se alternativas viáveis como formas vantajosas e sustentáveis de agregar valor às folhas de cravo da Índia, geralmente não utilizadas comercialmente. PLE e UAE se mostraram uma técnica de extração adequada para fins de rendimento das folhas de cravo, pois requer menos tempo de extração comparados aos exigidos para o processo de SFE, além de menor quantidade de solvente comparado aos métodos convencionais. Para fins antioxidantes e rendimento de eugenol o SFE destacou-se por apresentar valores superiores aos outros métodos realizados.

Portanto, este estudo revelou que os métodos por SFE com pressões superiores a 200 bar e as técnicas por PLE e UAE com solvente etanol apresentaram uma abordagem viável para a obtenção de extratos de folha de cravo (*Syzygium aromaticum*) com elevado teor de rendimento, rendimento de eugenol e capacidade antioxidante favorável.

## 6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados encontrados no presente estudo, verificou-se que as folhas de cravo da Índia (*Syzygium Aromaticum*) podem ser consideradas favoráveis para obtenção de extratos com alto teor de compostos fenólicos, atividade antioxidante, além de, elevado rendimento de eugenol.

O processo de extração etanólica assistida por ultrassom se mostrou eficiente na obtenção de extratos das folhas de cravo, com rendimentos de até 11,95%, correspondendo a uma eficiência de aproximadamente 61% em relação ao método convencional de maceração. A análise estatística mostrou que as variáveis: tempo, temperatura e a razão solvente/amostra tiveram efeitos positivos no rendimento.

A amplitude apresentou efeito mais significativo na extração de compostos com poder antioxidante, em decorrência do aumento da cavitação e efeitos mecânicos. No entanto, os valores de TCF, DPPH e FRAP, diminuíram em elevadas temperaturas, indicando que nessas condições, houve a extração de outros compostos sem poder antioxidante.

O comparativo dentre as técnicas de extração por maceração e com solvente assistida por ultrassom revelaram que ambos os métodos obtiveram extratos com capacidade antioxidante. No entanto, as atividades antioxidantes das folhas de cravo nos extratos utilizando UAE foram maiores em comparação aos obtidos por maceração.

Deve-se ressaltar que a UAE se mostrou um método de extração eficiente quando comparado ao método de maceração, a qual permitiu um maior rendimento e possibilidade de obter maior rendimento de eugenol, além de que essa técnica de extração apresenta vantagens tais como menor tempo de extração, alto rendimento e prevenção da degradação do extrato.

Nas extrações com CO<sub>2</sub> supercrítico e com líquido pressurizado, os resultados para ambas as técnicas se mostraram satisfatórios para o rendimento de extrato e eugenol. No método por PLE empregado com solvente etanol, verificou-se um efeito positivo da temperatura para o rendimento dos extratos, porém, a maior concentração de eugenol, foi obtido nos extratos obtidos por SFE (49%).

Ambas as técnicas estudadas, mostraram vantagem de reduzir o tempo de extração e consumo de solventes em relação á métodos convencionais de extração. Usando PLE, o maior rendimento ao final de 20 min foi de 6,54%, correspondendo a um rendimento de eugenol de 2,66 g eugenol por kg folhas. Já pela SFE, em 80 min, o rendimento foi de 1,94%, no entanto, com 8,06 g eugenol por kg folhas. Contudo, a SFE se mostrou vantajosa quando submetida em pressões mais elevadas.

Em relação às técnicas empregadas, ressalva-se a relevância em se obter um produto com elevada pureza no composto majoritário eugenol junto a um alto rendimento total. Diante disso, pelos resultados obtidos, a extração supercrítica à 60 °C foi a mais favorável para a extração das folhas de cravo da índia, uma vez que essa técnica não necessita de uma etapa de purificação posterior a extração para eliminação do solvente. Além disso, de acordo com os resultados, para o rendimento de extração, a alta temperatura foi determinante para aumentar essa resposta em todos os processos empregados.

## 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, A. E. M.; DARWISH, S. M.; AYAD, E. H. E.; EL-HAMAHMY, R. M. **Egyptian mango by-product 2: Antioxidant and antimicrobial activities of extract and oil from mango seed kernel.** Food Chemistry, v. 103, n. 4, p. 1141-1152, 2007.
- ABOUBAKR, H. A.; NAUERTZ, A.; LUONG, N. T.; AGRAWAL, S.; SOHAIMY, S. AA.; YOUOSSEF, M. M.; GOYAL, S. M. **In Vitro antiviral activity of clove and ginger aqueous extracts against feline calicivirus, a surrogate for human norovirus,** Journal of Food Protection, v.79, n.6, p. 1001-1012, 2016.
- AFFONSO, R. S.; RENNO, M. N.; SLANA, G. B. C. A.; FRANCA, T. C. **Chemical and biological aspects of the essential oil of Indian cloves.** Revista Virtual de Quimica, v. 4, n. 2, p. 146–161, 2012.
- AISHA, A. F. A.; ABU-SALAH, K. M.; ALROKAYAN, S. A.; SIDDIQUI, M. J.; ISMAIL, Z.; MAJID, M. S. A. **Syzygium aromaticum extracts as good source of betulinic acid and potential anti-breast câncer.** Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 22, n. 2, p.335-343, 2012.
- AJILA, C. M.; BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D.; VAL´ERRO, J. R. **Solid-state fermentation of apple pomace using Phanerocheate chrysosporium - Liberation and extraction of phenolic antioxidants.** Food Chemistry, v. 126, n. 3, p. 1071-1080, 2011.
- ALBUQUERQUE, B. R.; PRIETO, M. A.; BARREIRO, M. F.; RODRIGUES, A.; CURRAN, T. P.; BARROS, L.; FERREIRA, I. CFR. **Catechin-based extract optimization obtained from Arbutus unedo L. fruits using maceration/microwave/ultrasound extraction techniques.** Industrial Crops and Products, v. 95, p. 404–415, 2017.
- ALEXANDRU, L.; CRAVOTTO, G.; GIORDANA, L.; BINELLO, A.; CHEMAT, F. **Ultrasound-assisted extraction of clove buds using batch- and flow-reactors: A comparative study on a pilot scale.** Innovative Food Science and Emerging Technologies, v. 20, p. 167-172, 2013.
- ALMA, M. H.; ERTAS, M.; NITZ, S.; KOLLMANNSBERGER, H. **Chemical composition and content of essential oil from the bud of cultivated Turkish clove (Syzygium aromaticum L.).** BioResources, v. 2, n. 2, p. 265–269, 2007.
- ALMEIDA, P. P.; MEZZOMO, N.; FERREIRA, S. R. S. **Extraction of Mentha spicata L. Volatile Compounds: Evaluation of Process Parameters and Extract Composition.** Food and Bioprocess Technology, v. 5, n. 2, p. 548–559, 2012.
- ALONSO-CARRILLO, N.; AGUILAR-SANTAMARIA, M. A.; VERNON-CARTER, E. J; JIMENEZ-ALVARADO, R.; CRUZ-SOSA, F. ROMAN-GUERREIRO, A. **Extraction of phenolic compounds from Satureja macrostema using microwave-ultrasound assisted and reflux methods**

**and evaluation of their antioxidant activity and cytotoxicity.** *Industrial Crops and Products*, v. 103, n. 2, p. 213–221, 2017.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. **Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos.** *Química Nova*, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.

ALVES, T. P.; TRIQUES, C. C.; PALSIKOWSKI, P. A.; DA SILVA, C.; FIORESE, M. L.; DA SILVA, E. A.; KLEN, M. R. F. **Improved extraction of bioactive compounds from *Monteverdia aquifolia* leaves by pressurized-liquid and ultrasound-assisted extraction: Yield and chemical composition,** *The Journal of Supercritical Fluids*, v.181, p. 105468, 2022.

ANDREO, D.; JORGE, N. **Antioxidantes Naturais: Técnicas De Extração.** *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v. 24, n. 2, p. 319–336, 2006.

ANDRES, A. I.; PETRON, M. J.; LOPES, A. M.; TIMON, M. L. **Optimization of extraction conditions to improve phenolic content and in vitro antioxidant activity in craft brewers' spent grain using response surface methodology (rsm).** *Foods*, v. 9, n. 10, p. 1–15, 2020.

ANDREU, V.; PICÓ, Y. **Pressurized liquid extraction of organic contaminants in environmental and food samples.** *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 118, p. 709–721, 2019.

AOAC-Association of Official Analytical Chemist. *Official Methods of Analysis*, 19th ed. AOAC, Gaithersburg, 2012. 3000p

ASPÉ, E.; FERNÁNDEZ, K. **The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus radiata* Bark.** *Industrial Crops and Products*, v. 34, n. 1, p. 838–844, 2011.

AYOUB, Z.; MEHTA, A. **Medicinal plants as potential source of antioxidant agents: A review.** *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, v. 11, n. 6, p. 50–56, 2018.

AZMIR, J.; Z Aidul, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A. SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFoor, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. **Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review.** *Journal of Food Engineering*, v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013.

BAGETTA, G.; MARRONE, L. A.; ROMBOLA, L.; AMANTEA, D. RUSSO, R.; BERLIOCCHI, L.; SAKURADA, S.; SAKURADA, T. ROTIROTI, D.; CORASANITI, M. T. **Neuropharmacology of the essential oil of bergamot,** *Fitoterapia*, v. 81, n. 6, p. 453-461, 2010.

BAGHSHAHI, H.; RIASI, A.; MAHDAVI, A. H.; SHIRAZI, A. **Antioxidant effects of clove bud (*Syzygium aromaticum*) extract used with different extenders**



- on ram spermatozoa during cryopreservation. *Cryobiology*, v. 69, n.3, p. 482- 487, 2014.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. **Biological effects of essential oils - A review.** *Food and Chemical Toxicology*, v.46, n. 2, p. 46-475, 2008.
- BARROS GOMES, P. R.; FILHO, V. E. M.; RAMELO, W. F.; NASCIMENTO, A. A.; LOUZEIRO, H. C.; da SILVA, W. **Caracterização química e citotoxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*).** *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, v. 47, n. 1, p. 37–52, 2018.
- BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils: Science, technology and applications.** 2010.
- BERMEJO, D. V.; MENDIOLA, J. A.; IBANEZ, E.; REGLERO, G.; FORNARI, T. **Pressurized liquid extraction of caffeine and catechins from green tea leaves using ethyl lactate, water and ethyl lactate + water mixtures.** *Food and Bioproducts Processing*, v.96, p.106-112, 2015.
- BHUIYAN, M. N. I.; BEGUM, J.; NANDI, N. C.; AKTER, F. **Constituents of the essential oil from leaves and buds of clove (*Syzygium caryophyllatum* (L.) Alston).** *African Journal of Plant Science*, v. 4, p. 451–454, 2010.
- BOEIRA, C. P. PIOVESAN, N.; SOQUETTA, B.; FLORES, D. C. B.; LUCAS, B. N.; BARIN, J. S.; ROSA, C. S.; TERRA, N. N. **Ultrasonic assisted extraction to obtain bioactive, antioxidant and antimicrobial compounds from marcela.** *Ciencia Rural*, v. 48, n. 6, p. 1–6, 2018.
- BRUNNER, G. **Gás Extraction. An Introduction to fundamentals of supercritical fluids and the applications to separation processes 1.** Ed. Darstad, Alemaha: Steinkopff, 1994, 387p.
- BRUNNER, G. **Supercritical fluids: Technology and application to food processing.** *Journal of Food Engineering*, v. 67, n. 1–2, p. 21–33, 2005.
- BURIN, V. M.; FERREIRA-LIMA, N. E.; PANCERI, C. P.; BORDIGNONLUIZ, M. T. **Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes: evaluation of diferente extraction methods.** *Microchemical Journal*, v. 114, p. 155-163, 2014.
- CACIQUE, A. P. BARBOSA, E. S.; PINHO, G. P. **Maceration extraction conditions for determining the phenolic compounds and the antioxidant activity of *catharanthus roseus* (L.) g. don.** *Ciencia e Agrotecnologia*, v. 44, p. 1–12, 2020.
- CAI, L.; WU, C. D. **Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens.** *Journal of Natural Products*, v. 59, n. 10, p. 987–990, 1996.
- CAMPONE, L. CELANO, R.; PICCINELLI, A. L. PAGANO, I.; CARABETTA, S. SANZO, R.; RUSSO, M.; IBANEZ, E.; CIFUENTES, A.; RASTRELLI, L. **Response surface methodology to optimize supercritical carbon**

**dioxide/co-solvent extraction of brown onion skin by-product as source of nutraceutical compounds.** Food Chemistry, v. 269, n. March, p. 495–502, 2018.

CAPELLINI, M. C.; GIACOMINI, V.; CUEVAS, M. S.; RODRIGUES, C. E. C. **Rice bran oil extraction using alcoholic solvents: Physicochemical characterization of oil and protein fraction functionality.** Industrial Crops and Products, v. 104, n. out., 2017.

CARVALHO, T. R. B.; TANAKA, E. B.; VILHENA, A. T.; FRADE, P. C. R.; FONSECA, R. R. S.; RODRIGUES, T. M. S.; BRITO, M. P.; SILVA, S. G.; JUNIOR, R. N. C.; DE OLIVEIRA, M. S.; ANDRADE, E. H. A.; OLIVEIRA-FILHO, A. B.; MENEZES, S. A. F. **Chemical composition, antimicrobial and antifungal activity of Lippia Thymoides essential oil in oral pathogens,** Brazilian Journal of Oral Sciences, v. 20, p. 210-219, 2021.

CHAIEB, K.; HAJLAOUI, H.; ZMANTAR, T.; KAHLA-NAKBI, A. B.; ROUABHIA, M.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUT, A. **The chemical composition and biological activity of clove essential oil, Eugenia caryophyllata (Syzygium aromaticum L. Myrtaceae): a short review.** Phytotherapy Research, v. 21, p. 501–506, 2007.

CHEAH, E. L. C.; HENG, P. W. S.; CHAN, L. W. **Optimization of supercritical fluid extraction and pressurized liquid extraction of active principles from Magnolia officinalis using the Taguchi design.** Separation and Purification Technology, v. 71, n. 3, p. 293–301, 2010.

CHEMAT, F.; ROMBAUT, N. SICAIRE, A. G.; MEULLEMIESTRE, A. TIXIER, A. S. F.; VIAN, M. A. **Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. Ultrasonics Sonochemistry,** v. 34, p. 540–560, 2017.

CHEMAT, F.; VIAN, M. A.; FABIANO-TIXIER, A-S.; NUTRIZIO, M.; JAMBRAK, A. R.; MUNEKATA, P. E. S.; LORENZO, J. M.; BARBA, F. J.; BELLO, A.; CRAVOTTO, G. **A review of sustainable and intensified techniques for extraction of food and natural products.** Green Chem, v. 22, p. 2325-2353, 2020.

CHEMAT, F.; ZILL-E-HUMA; KHAN, M. K. **Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction.** Ultrasonics Sonochemistry. Anais...2011

CHEN, W.; HUANG, Y. QI, J.; THANG, M.; ZHENG, Y.; ZHAO, S.; CHEN, L. **Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from areca husk.** Journal of Food Processing and Preservation, p. 1745-4549, 2014.

CORTES-ROJAS, D. F.; DE SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. **Clove (Syzygium aromaticum): a precious spice.** J. Trop. Biomed, v. 4, p. 90–96, 2014.

COWAN, M. M. **Plant products as antimicrobial agents**. Clinical microbiology reviews, 1999.

CRUZ, P. N.; FETZER, D. L.; AMARAL, W.; ANDRADE, E. F.; CORAZZA, M. L.; MASSON, M. L. **Antioxidant activity and fatty acid profile of yacon leaves extracts obtained by supercritical CO<sub>2</sub> + ethanol solvent**. Journal of Supercritical Fluids, v. 146, n. November 2018, p. 55–64, 2019.

CRUZ, P. N.; PEREIRA, T. C. S.; GUIANDANI, C.; OLIVEIRA, D. A.; ROSSI, M. J.; FERREIRA, S. R. S. **Antioxidant and antibacterial potential of butia (Butia catarinensis) seed extracts obtained by supercritical fluid extraction**. Journal of Supercritical Fluids, v. 119, p. 229–237, 2017.

CUI, H.; BAI, M.; RASHED, M. M. A.; LIN, L. **The antibacterial activity of clove oil/ chitosan nanoparticles embedded gelatin nanofibers against Escherichia coli O157:H7 biofilms on cucumber**. International Journal of Food Microbiology, v. 266, p. 69–78, 2008.

CUNHA, M. A. E.; NEVES, R. F.; SOUZA, J. N. S.; FRANÇA, L. F.; ARAUJO, M. E.; BRUNNER, G. MACHADO, N. T. **Supercritical adsorption of buriti oil (Mauritia flexuosa Mart.) in  $\gamma$ -alumina: A methodology for the enriching of anti-oxidants**. Journal of Supercritical Fluids, v. 66, p. 181–191, 2012.

DA SILVA, I. C. M.; SANTOS, W. L.; LEAL, I. C. R.; ZOGHBI, M. G. B.; FEIRHMANN, A. C.; CABRAL, V. F.; MACEDO, E. N.; CARDOZO-FILHO, L. **Extraction of essential oil from Cyperus articulatus L. var. articulatus (priprioca) with pressurized CO<sub>2</sub>**. Journal of Supercritical Fluids, v. 88, p. 134–141, 2014.

DA SILVA, R. P. F. F.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; DUARTE, A. C. **Supercritical fluid extraction of bioactive compounds**. TrAC - Trends in Analytical Chemistry, v. 76, p. 40–51, 2016.

DANIELSKI, L.; BRUNNER, G.; SCHWANKE, C.; ZETZL, C.; HENSE, H. DANOSO, P. M. **Deterpenation of mandarin (Citrus reticulata) peel oils by means of countercurrent multistage extraction and adsorption/desorption with supercritical CO<sub>2</sub>**. Journal of Supercritical Fluids, v. 44, n. 3, p. 315–324, 2008.

DAUGSCH, A.; PASTORE, G. **Production of vanillin: A biotechnological opportunity**. Quimica Nova, v. 28, n. 4, p. 642–645, 2005.

DE MELLO, V.; PRATA, M. C.; DA SILVA, M. R.; DAEMON, S. E.; da SILVA, . S.; GUIMARÃES, S. F. G.; MENDONÇA, A. E.; LOUCURA, E.; VILELA, F. M. P.; AMARAL, L. H.; CABRAL, L. M.; do AMARAL, M. P. H. **Acaricidal properties of the formulations based on essential oils from Cymbopogon winterianus and Syzygium aromaticum plants**. Parasitology Research, v.113, n. 12, p. 4431-4437, 2014.

DE OLIVEIRA, M. S.; DA COSTA, W. A.; PEREIRA, D. S.; BOTELHO, J. R. S.; MENEZES, T. O. A.; ANDRADE, E. H. A.; DA SILVA, S. H. M.; FILHO, A. P. S. S.; JUNIOR, R. N. C. **Chemical composition and phytotoxic activity of clove**

**(*Syzygium aromaticum*) essential oil obtained with supercritical CO<sub>2</sub>.** J. of Supercritical Fluids, v. 118, p.185-93, 2016.

DEBIEN, I. C. N.; VARDANEGA, R.; SANTOS, D. T.; MEIRELES, M. A. A. **Pressurized liquid extraction as a promising and economically feasible technique for obtaining beta-ecdysone-rich extracts from Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata*) roots.** Separation Science and Technology, v.50, p. 1647 -1657, 2015.

DEL RÉ, P. V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde; **Spices as natural antioxidants: their application in food and implication for health.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 14, n. 2, p. 389-399, 2012.

DEMO, A. PETRAKIS, C.; KEFALAS, P.; BOSKOU, D. **Nutrient antioxidants in some herbs and Mediterranean plant leaves.** Food Research International, v. 31, n. 5, p.351- 354, 1998.

DENG, J.; XU, Z.; XIANG, C.; LIU, J.; ZHOU, L. LI, T. YANG, Z.; DING, C. **Comparative evaluation of maceration and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from fresh olives.** Ultrasonics Sonochemistry, v. 37, n. julho, p. 328-334, 2017.

DIAS, A. L. B.; DE AGUIAR, A. C.; ROSTAGNO, M. A. **Extraction of natural products using supercritical fluids and pressurized liquids assisted by ultrasound: Current status and trends.** Ultrasonics Sonochemistry, v. 74, p.105584, 2021.

DÍAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; DOMINGUEZ, H. PARAJÓ, J. C. **Supercritical CO<sub>2</sub> extraction and purification of compounds with antioxidant activity.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 54, n. 7, p. 2441–2469, 2006.

ECONOMOU, K. D.; OREOPOULOU, V.; THOMOPOULOS, C. D. **Antioxidant activity of some plant extracts of the family labiatae.** Journal of the American Oil Chemists Society, v. 68, p. 109-113,1991.

EKART, M. P.; BENNETT, K. L.; EKART, S. M.; GURDIAL, G. S.; LIOTTA, C. L.; ECHERTK, C. A. **Cosolvent interactions in supercritical fluid solutions.** AIChE Journal, v. 39, n. 2, p. 235–248, 1993.

EL-MAATI, M. F. A.; MAHGOUB, S. A.; LABIB, S. L.; AL-GABY, A. M. A.; RAMADAN, M. F. **Phenolic extracts of clove (*Syzygium aromaticum*) with novel antioxidant and antibacterial activities.** European Journal of Integrative Medicine, v. 8, n. 4, p. 494-504, 2016.

EL-SHOUNY, W. A.; ALI, S. S.; HEGAZY, H. M.; ELNABI, M. K. A.; ALI, A.; SUN. J. ***Syzygium aromaticum* L.: Traditional herbal medicine against cagA and vacA toxin genes-producing drug resistant *Helicobacter pylori*,** Journal of Traditional and Complementary Medicine, v. 10, p. 366-377, 2020.

EL-TOHAMY, R.; ALI, S. S.; KHALID, S. A.; FAREED, M.; ALI, A.; EL-BADRY, A.; EL-ZAWAWY, N. A.; WU, J.; SUN, J.; MAO, G-H.; RUPANI, P. F.

**Phytochemical analysis and assessment of antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plant species from Egyptian flora.** Journal of Applied Biomedicine, v.16, n. 4, p. 289-300, 2018.

EMBRAPA, 2021 <<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/agroenergia/alcool>> Acesso em 29.10.2021.

ENUJIUGHA, V. N.; TALABI, J. Y.; MALOMO, S. A.; OLAGUNJU, A. L. **DPPH Radical Scavenging Capacity of Phenolic Extracts from African Yam Bean (*Sphenostylis stenocarpa*)**, Food and Nutrition Sciences, v. 3, n. 1, p. 7-13, 2012.

ERKAN, N.; AYRANCI, G.; AYRANCI, E. **Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol.** Food Chemistry, v. 110, n. 1, p. 79-82, 2008.

ESCLAPEZ, M. D.; GARCIA-PEREZ, J. V.; MULET, A.; CARCEL, J. A. **Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products.** Food Engineering Reviews, v. 3, p. 108-120, 2011.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Fundação Osvaldo Cruz, v. 2, 6ed. 2019.

FAUZYA, A. F.; ASTUTI, R. I.; MUBARIK, N. R. **Effect of Ethanol-Derived Clove Leaf Extract on the Oxidative Stress Response in Yeast *Schizosaccharomyces pombe*.** International Journal of Microbiology, p.1-7, 2019.

FERREIRA, M. A.; CARVALHO, T.C.; TURATTI, I. C. C.; FURTADO, N. A. A. C.; MARTINS, C. H. G.; LOPES, N. P. **Antimicrobial activity of *Aegiphila sellowiana* Cham., Lamiaceae, against oral pathogens.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 20, n. 2, p. 246–249, 2010.

FORNARI, T.; VICENTE, G.; VAZQUEZ, E.; GARCIA-RISCO, M. R.; REGLERO, G. **Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction.** Journal of Chromatography A, v. 1250, p. 34–48, 2012.

FREITAS, A. C. D.; CUNICO, L. P.; AZNAR, M.; GUIRARDELLO, R. **Modeling vapor liquid equilibrium of ionic liquids + gas binary systems at high pressure with cubic equations of state.** Brazilian J. of Chemical Engineering, v. 30, n. 1, p. 63-73, 2013.

FROHLICH, P. C.; SANTOS, K. A.; PALÚ, F.; CARDOZO-FILHO, L.; DA SILVA, C.; DA SILVA, E. A. **Evaluation of the effects of temperature and pressure on the extraction of eugenol from clove (*Syzygium aromaticum*) leaves using supercritical CO<sub>2</sub>.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 143, p.313-320, 2019.

GADKARI, P. V.; BALARAMAN, M. **Mass transfer and kinetic modelling of supercritical CO<sub>2</sub> extraction of fresh tea leaves (*Camellia sinensis* L.).** Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 34, n. 3, p.799-810, 2017.

GARCIA-MENDOZA, M. DEL P.; ESPINOSA-PARDO, F. A. BASEGGIO, A. M.; BARBERO, G. F.; MAROSTICA, M. R.; ROSTAGNO, M. A.; MARTINEZ, J. **Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from juçara (*Euterpe edulis Mart.*) residues using pressurized liquids and supercritical fluids.** Journal of Supercritical Fluids, v. 119, p. 9–16, 2017.

GAYLOR, R.; BOULANGER, R.; JAHIEL, M.; RAMANOELINA, P.; FAWBUSH, F.; LEBRUN, M.; DANTHU, P. **Variations in yield and composition of leaf essential oil from *Syzygium aromaticum* at various phases of development International.** Journal of Basic and Applied Sciences, v. 5, n.1, p. 90-94, 2016.

GAYLOR, R.; JAHIEL, M.; DUCLOS, T.; RAMANOELINA, P.; FAWBUSH, F.; DANTHU, P. **Bud, leaf and stem essential oil composition of *Syzygium aromaticum* from Madagascar, Indonesia and Zanzibar.** International Journal of Basic and Applied Sciences, v. 3, n.3, p.224-233, 2014.

GOLMAKANI, E.; MOHAMMADI, A.; SANI, T. A.; KAMALI, H. **Phenolic and flavonoid content, and antioxidants capacity of pressurized liquid extraction and percolation method from roots of *Scutellaria pinnatifida* A. Hamilt. sub sp alpina (Bornm) Rech. f.** Journal Supercritical Fluids, v. 95, p.318-324, 2014.

GOULA, A. M.; VERVERI, M.; ADAMOPOULOU, A.; KADERIDES, K. **Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids from pomegranate wastes using vegetable oils.** Ultrasonics Sonochemistry, v. 34, p. 821-830, 2017.

GUAN, W.; SHUFEN, L.; RUIXIANG, Y.; SHAOKUN, T.; CAN, Q. **Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods.** Food Chemistry, v. 101, n. 4, p.1558-1564, 2007.

GUPTA R.; SINGH M.; SHARMA, A. **Neuroprotective effect of antioxidants on ischaemia and reperfusion-induced cerebral injury.** Pharmacol Research; v.48, n. 2, p. 209- 215, 2003

HADIZADEH, I.; PEIVASTEGAN, B.; HAMZEHZARGHANI, H. **Antifungal activity of essential oils from some medicinal plants of Iran against *Alternaria alternata*.** American Journal of Applied Sciences, v. 6, n. 5, p. 857–861, 2009.

HALLIWELL, B.; MURCIA, M. A.; CHIRICO, S. ARUOMA, I. **Free Radicals and Antioxidants in Food and In Vivo: What They Do and How They Work.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 35, n. 1–2, p. 7–20, 1995.

HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBAÑEZ, E. **Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae - A review.** Food Chemistry, v. 98, n. 1, p. 136–148, 2006.

HIRONDART, M.; ROMBAUT, N.; FABIANO-TIXIER, A.; BILY, A.; CHEMAT, F. **Comparison between pressurized liquid extraction and conventional**

**Soxhlet extraction for rosemary antioxidants, yield, composition, and environmental footprint.** *Foods*, v.584, 2020.

HO, T. C.; KIDDANE, A. T.; KHAN, F.; CHO, Y.-J.; PARK, J.-S.; LEE, H.-J.; KIM, G.-D.; KIM, Y.-M.; CHUN, B.-S. **Pressurized liquid extraction of phenolics from *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk leaves: Optimization, characterization, and biofunctional properties.** *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v.108, p. 418-428, 2022.

HRAŠ, A. R.; HADOLIN, M.; KNEZ, Z.; BAUMAN, D. **Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with  $\alpha$ -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil.** *Food Chemistry*, v. 71, n. 2, p. 229-233, 2000.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. **The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

HUANG, Y.; HO, S.-H.; LEE, H.-C.; YAP, Y.-I. **Insecticidal properties of eugenol, isoeugenol and methyleugenol and their effects on nutrition of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae).** *Journal of Stored Products Research*, v. 38, n. 5, p. 403–412, 2002.

HUBER, W.; MOLERO, A.; PEREYRA, C.; OSSA, M. **Dynamic supercritical CO<sub>2</sub> extraction for removal of cholesterol from anhydrous milk fat.** *International Journal of Food Science and Technology*, v. 31, n. 2, p. 143–151, 1996.

IFTEKHAR, S.; RAMASAMY, D. L.; SRIVASTAVA, V.; ASIF, M. B.; SILLANPAA, M. **Understanding the factors affecting the adsorption of Lanthanum using different adsorbents: A critical review.** *Chemosphere*, v. 204, p. 413–430, 2018.

INAM, F.; DEO, S. AND; NARKHEDE, N. **HPLC-UV Method Development and Quantification of Eugenol from Methanolic Extracts of Some Spices.** *International Journal of Chemical and Physical Sciences*, 2014.

ISMAIL, B. B.; GUO, M.; PU, Y.; WANG, W.; YE, X.; LIU, D. **Valorisation of baobab (*Adansonia digitata*) seeds by ultrasound assisted extraction of polyphenolics. Optimisation and comparison with conventional methods.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 52, p.257-267, 2019.

JIRARATTANARANGSRI, W.; MUANGRAT, R. **Comparison of supercritical CO<sub>2</sub> and screw press extraction methods for producing oil from *Camellia sinensis* var. *assamica* seeds: Physicochemical properties and antioxidant activity.** *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, v. 31, p.100413, 2022.

JOVANOVIĆ, A. A.; DORDEVIC, V. B.; ZDUNIC, G. M.; PLJEVLJAKUSIC, D. S.; SAVIKIN, K. P.; GODEVAC, D. M.; BUGARSKI, B. M. **Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using**

**maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques.** Separation and Purification Technology, v. 179, p. 369–380, 2017.

KAMALI, H.; KHODAVERDI, E.; HADIZADEHB, F.; GHAZIASKAR, S.H. **Optimization of phenolic and flavonoid content and antioxidants capacity of pressurized liquid extraction from *Dracocephalum kotschyi* via circumscribed central composite.** Journal Supercritical Fluids, v.107, p.307-314, 2016.

KAMATOU, G. P.; VERMAAK, I.; VILJOEN, A. M. **Eugenol - From the remote Maluku Islands to the international market place: A review of a remarkable and versatile molecule.** Molecules, v. 17, n. 6, p. 6953–6981, 2012.

KHAW, K.-Y.; PARAT, M. O; SHAW, P. N.; FALCONER, J. R. **Solvent Supercritical Fluid Technologies to Extract Bioactive Compounds from Natural Sources: a Review,** Molecular, v.22, p. 1189, 2017.

KIMBARIS, A. C.; SIATIS, N. G.; DAFERERA, D. J.; TARANTILIS, P. A.; PAPPAS, C. S.; POLISSIOU, M. G. **Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*).** Ultrasonics Sonochemistry, v. 13, n. 1, p. 54-60, 2006.

KLEIN, E. J.; NATHIA-NEVES, G.; VARDANEGA, R.; MEIRELES, M. A. A.; da SILVA, E. A.; VIEIRA, M. G. A. **Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of A-/B-amyirin from uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess.): Effects of pressure and co-solvent addition.** Journal of Supercritical Fluids, v. 153, p. 1–6, 2019.

KOTOVICZ, V.; WYPYCH, F.; ZANOELO, E. F. **Pulsed hydrostatic pressure and ultrasound assisted extraction of soluble matter from mate leaves (*Ilex paraguariensis*): Experiments and modeling.** Separation and Purification Technology, v.132, p. 1-9, 2014.

KRAUJALIENE, V.; PAKALSKAS, A.; VENSKUTONIS, P. R. **Multi-stage recovery of phytochemicals from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) flowers by supercritical fluid and pressurized liquid extraction methods.** Industrial Crops & Products, v.107, p. 271-280, 2017.

KREGER, B. E.; CRAVEN, D. E.; MCCABE, W. R. **Gram-negative bacteremia. IV. Re-evaluation of clinical features and treatment in 612 patients.** The American Journal of Medicine, v.68, n. 3, p.344-355, 1980.

KRINSKY, N. I. **The antioxidant and biological properties of the carotenoids.** Annals of the New York Academy of Sciences, v. 854, p. 443–447, 1998.

KRZYCZKOWSKA, J.; KOZŁOWSKA, M. **Effect of Oils Extracted from Plant Seeds on the Growth and Lipolytic Activity of *Yarrowia lipolytica* Yeast.** J Am Oil Chem Soc, v. 94, p.661-671, 2017.

LARGITTE, L.; PASQUIER, R. **A review of the kinetics adsorption models and their application to the adsorption of lead by an activated carbon.** Chemical Engineering Research and Design, v. 109, p. 495–504, 2016.



LEILA, M., RATIBA, D., AL-MARZOUQI, A.H. **Experimental and mathematical modelling data of green process of essential oil extraction: supercritical CO<sub>2</sub> extraction.** Mater. Today Proc., v.49, p. 1023-1029, 2022.

LINDBERG MADSEN, H.; BERTELSEN, G. **Spices as antioxidants.** Trends in Food Science and Technology, v. 6, n. 8, p. 271–277, 1995.

LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. **Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays.** Analytica Chimica Acta, v. 763, p. 1–10, 2013.

LUCAS, S.; COCERO, M. J. **Improvement of soluble coffee aroma using an integrated process of supercritical CO<sub>2</sub> extraction with selective removal of the pungent volatiles by adsorption on activated carbon.** Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 23, n. 2, p. 197–203, 2006.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; GARCÍA-AYUSO, L. E. **Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future.** Analytica Chimica Acta, v. 369, n. 1–2, p. 1–10, 1998.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; PRIEGO-CAPOTE, F. **Soxhlet extraction: Past and present panacea.** Journal of Chromatography A, v. 1217, n. 16, p. 2383–2389, 2010.

MAHAPATRA, S. K.; ROY, S. **Phytopharmacological approach of free radical scavenging and anti-oxidative potential of eugenol and Ocimum gratissimum Linn.** Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, v. 7 (Suppl 1): S391-S397, 2014.

MAHINDRAKAR, K. V.; RATHOD, V. K. **Ultrasonic assisted aqueous extraction of catechin and gallic acid from Syzygium cumini seed kernel and evaluation of total phenolic, flavonoid contents and antioxidant activity.** Chemical Engineering and Processing - Process Intensification, 2020.

MASTELIĆ, J.; JERKOVIC, I.; BLAZEVIĆ, I.; POLJAK-BLAZI, M.; BOROVIĆ, S. IVANCIĆ-BAĆE, I.; SMRECKI, V.; ZARKOVIC, N.; BRČIĆ-KOSTIĆ, K.; VIKIĆ-TOPIĆ, D.; MÜLLER, N. **Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 56, n. 11, p. 3989 – 3996, 2008.

MAZZUTTI, S.; RIEHL, C. A. S.; IBANEZ, E.; FERREIRA, S. R. S. **Green-based methods to obtain bioactive extracts from Plantago major and Plantago lanceolata.** Journal of Supercritical Fluids, v. 119, p. 211–220, 2017.

MCCORD, J. F.; WILSON, M. C. **Social problems in geriatric dentistry: an overview.** Gerodontology, v. 11, n. 2, p. 63–66, 1994.

MENDES, R. L.; NOBRE, B. P.; CARDOSO, M. T.; ANTONIO, A. P. P. **Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae.** Inorganica Chimica Acta, v. 356, p. 328–334, 2003.

MIČIĆ, V.; NOVAKOVIC, D.; JOTANOVIC, M.; LEPOJEVIC, Z. **Supercritical Fluid Extraction With Carbon Dioxide At Different Pressures**. Contemporary Materials, v. 2, n. 1, p. 84–87, 2011.

MINOZZO, M.; POPIOLSKI, A.; DAL PRA, V.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V.; MOSSI, A. J.; MAZUTTI, M. A. **Modeling of the overall kinetic extraction from maytenus aquifolia using compressed CO<sub>2</sub>**. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 29, n. 4, p. 835-843, 2012.

MITTAL, R.; TAVANANDI, H. A.; MANTRI, V. A.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. **Ultrasound assisted methods for enhanced extraction of phycobiliproteins from marine macro-algae, Gelidium pusillum (Rhodophyta)**. Ultrasonics Sonochemistry, v. 38, p. 92–103, 2017.

MOHAMMAD NAZRUL ISLAM BHUIYAN. **Constituents of the essential oil from leaves and buds of clove (Syzigium caryophyllatum (L.) Alston)**. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, v. 6, n. 16, 2012.

MOHAMMADPOUR, H.; SADRAMELI, S. M.; ESLAMI, F.; ASOODEH, A. **Optimization of ultrasound-assisted extraction of Moringa peregrina oil with response surface methodology and comparison with Soxhlet method**. Industrial Crops and Products, v. 131, p. 106-116, 2019.

MONROY, Y. M.; RODRIGUES, R. A. F.; SASTORATTO, A.; CABRAL, F. A. **Influence of ethanol, water, and their mixtures as co-solvents of the supercritical carbon dioxide in the extraction of phenolics from purple corn cob (Zea mays L.)**. Journal of Supercritical Fluids, v. 118, p. 11–18, 2016.

MUSTAFA, A.; TURNER, C. **Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review**. Analytica Chimica Acta, Amsterdam, v. 703, n. 1, p. 8-18, 2011.

MYINT, S.; DUAD, R. W.; MOHAMAD, A. B.; KADHUM, A. A. H. **Gas chromatographic determination of eugenol in ethanol extract of cloves**. Journal of Chromatography B: Biomedical Applications, v. 679, n. 1–2, p. 193–195, 1996.

NAGAVEKAR, N.; SINGHAL, R. S. **Enhanced extraction of oleoresin from Piper nigrum by supercritical carbon dioxide using ethanol as a co-solvent and its bioactivity profile**. Journal of Food Process Engineering, v. 41, n. 1, p. 1–12, 2018.

NAIR, P. N. R.; HENRIQUE, S.; CANO, V.; VERA, J. **Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “one-visit” endodontic treatment**. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology, v. 99, n. 2, p. 231–252, 2005.

NAMIKI, M. **Antioxidants/antimutagens in food**. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1990.

- NAVARRO, S. L. B.; CAPELLINI, M. C.; ARACAVA, K. K.; RODRIGUES, C. E. C. **Corn germ-bran oils extracted with alcoholic solvents: Extraction yield, oil composition and evaluation of protein solubility of defatted meal.** Food and Bioproducts Processing, v. 100, p. 185-194, 2016.
- NERIO, L. S.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. **Repellent activity of essential oils: A review.** Bioresource Technology, 2010.
- NIETO, A.; BORRULL, F.; POCURULL, E.; MARCÉ, R. M. **Pressurized liquid extraction: A useful technique to extract pharmaceuticals and personalcare products from sewage sludge.** TrAC - Trends in Analytical Chemistry, v. 29, n. 7, p. 752–764, 2010.
- NN, A. **A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation.** Medicinal & Aromatic Plants, v. 04, n. 03, p. 3–8, 2015.
- OGATA, M.; HOSHI, M.; URANO, S.; ENDO, T. **Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds.** Chemical and Pharmaceutical Bulletin, v. 48, n. 10, p. 1467-1469, 2000.
- ORSINE, J. V. C. OLIVEIRA, F. P. MENDES, P. N. R. **Antioxidant activity of natural spices commonly used in the food practices of the Brazilian population.** Brazilian Journal of Health Review, v. 6, n. 2, p. 6248-6259, 2023.
- OSÓRIO-TOBÓN, J. F.; MEIRELES, M. A. A. **Recent Applications of Pressurized Fluid Extraction: Curcuminoids Extraction with Pressurized Liquids.** Food and Public Health, v.6, n. 3, p. 289-303, 2013.
- PALSIKOWSKI, P. A.; BESEN, L. M.; KLEIN, E. J.; da SILVA, C.; da SILVA, E. A. **Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from *B. forficata* subsp. *Pruinosa*.** Canadian Journal of Chemical Engineering, v. 98, n. 10, p. 2214–2226, 2020.
- PAVELA, R. **Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review.** Industrial Crops and Products, v. 76, p. 174-187, 2015.
- PAVITHRA, B. **Eugenol - A review.** Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, v. 6, n. 3, p. 153-154, 2014.
- PEREIRA, A. DE A.; CARDOSO, M. G.; ABREU, L. R.; MORAIS, A. R.; GUIMARÃES, L. G. L. SALGADO, A. P. S. P. **Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.** Ciência e Agrotecnologia, v. 32, n. 3, p. 887–893, 2008.
- PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A. **Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, applications and economic perspectives.** Food and Bioprocess Technology, v. 3, n. 3, p. 340–372, 2010.
- PEREIRA, D. T. V.; TARONE, A. G.; CAZARIN, C. B. B.; BARBERO, G. F.; Martínez, J. **Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from grape marc.** Journal of Food Engineering, v.240, p.105-113, 2019.

PERRIER, A.; DELSART, C.; BOUSSETTA, N.; GRIMI, N.; CITEU, M.; VOROBIEV, E. **Effect of ultrasound and green solvents addition on the oil extraction efficiency from rapeseed flakes.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 39, n. nov., p. 58–65, 2017.

PINTO, E.; VALE-SILVA, L.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. **Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species.** *Journal of Medical Microbiology*, v. 58, n. 11, p. 1454–1462, 2009.

POLITEO, O.; JUKIC, M.; MILOS, M. **Comparison of chemical composition and antioxidant activity of glycosidically bound and free volatiles from clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.).** *Journal of Food Biochemistry*, v. 34, n. 1, p. 129–141, 2010.

POMPEU, D. R.; SILVA, E. M.; ROGEZ, H. **Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology.** *Bioresource Technology*, v. 100, n. 23, p. 6076–6082, 2009.

POURMORTAZAVI, S. M.; HAJIMIRSADEGHI, S. S. **Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis.** *Journal of Chromatography A*, v. 1163, n. 1–2, p. 2–24, 2007.

POURMORTAZAVI, S. M.; SAGHAFI, Z.; EHSANI, A.; YOUSSEFI, M. **Application of supercritical fluids in cholesterol extraction from foodstuffs: a review.** *Journal of Food Science and Technology*, v. 55, n. 8, p. 2813–2823, 2018.

POVH, N. P.; GARVIA, C. A.; MARQUES, M. O.; MEIRELES, M. A. A. **Extraction of essential oil and oleoresin from chamomile (*Chamomila recutita* [L.] Rauschert) by steam distillation and extraction with organic solvents: A process design approach.** *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2001.

PRATT, D. D. **Conceptions of teaching.** *Adult Education Quarterly*, v. 42, n. 4, p. 203–220, 1992.

PRIEFERT, H.; RABENHORST, J.; STEINBÜCHEL, A. **Biotechnological production of vanillin.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 56, n. 3-4, p. 296-314, 2001.

PRIOR, R. L.; CAO, G. **In Vivo Total Antioxidant Capacity: Comparison of Different Analytical Methods.** *Free Radical Biology & Medicine*, v.27, p.1173-1181, 1999.

PRIOR, R. L.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M. HUANG, D.; OU, B.; JACOB, R. **Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food**

**samples.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 51, n. 11, p. 3273–3279, 2003.

PRONYK, C.; MAZZA, G. **Design and scale-up of pressurized fluid extractors for food and bioproducts.** Journal of Food Engineering, v. 95, n. 2, p. 215–226, 2009.

PUJIARTI, R.; HUMAIROH, A.; WIBISONO, M. G.; HARDIYANTO, E. B. **Effect of chopping on yield, physico-chemical properties, and chemical composition of Clove (*Syzygium aromaticum* L.) leaf essential from three varieties.** IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, v. 449, n. 1, 2020.

PUROHIT, A. J.; GOGATE, P. R. **Ultrasound-Assisted Extraction of  $\beta$ -Carotene from Waste Carrot Residue: Effect of Operating Parameters and Type of Ultrasonic Irradiation.** Separation Science and Technology (Philadelphia), v. 50, n. 10, p. 1507–1517, 2015.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. **Methods of extraction and/or concentration of compounds found in biological fluids for subsequent chromatographic determination.** Quim. Nova. v. 24, n. 1, p. 68–76, 2001.

RADÜNZ, M.; TRINDADE, M. L. M.; CAMARGO, T. M.; RADUNZ, A. L.; BORGES, C. D.; GANDRA, E. A.; HELBIG, E. **Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil.** Food Chemistry, v. 276, p. 180-186, 2019.

RAINA, V. K.; SRIVASTAVA, S. K.; AGGARWAL, K. K.; SYAMASUNDAR, K. V.; KUMAR, S. **Essential oil composition of *Syzygium aromaticum* leaf from Little Andaman, India.** Flavour and Fragrance Journal, v. 16, n. 5, p. 334–336, 2001.

RAMYA, V.; NIDONI, U.; HIREGOUDAR, S.; RAMACHANDRA, C.T.; ASHOKA, J.; LAVANYA, V. **Process optimization of supercritical carbon dioxide (SC-CO<sub>2</sub>) extraction parameters for extraction of deoxynojirimycin (1-DNJ) from mulberry (*Morus alba* L.) leaves,** J. Appl. Nat. Sci, v.8, p. 405-411, 2016.

RANA, T.; KASHMIRI, M. A.; AHMAD, N. **Studies of antioxidant activity of essential oils of Umbelliferae Family.** Pakistan Journal of Science, v. 62, p. 67–70, 2010.

RANGHOO-SANMUKHIYAA, V. M.; CHELLAN, Y.; GOVINDEN-SOULANGEA, J.; LAMBRECHTS, I. A.; STAPELBERG, J.; CRAMPTON, B.; LALL, N. **Biochemical and phylogenetic analysis of *Eugenia* and *Syzygium* species from Mauritius.** Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, v.12, p. 21-29, 2019.

RASSEM, H.; NOUR, A.; R. M., Y. **Techniques For Extraction of Essential Oils From Plants: A Review.** Australian Journal of Basic and Applied Sciences, v. 10, n. 16, p. 117–127, 2016.

REGNAULT-ROGER, C.; VINCENT, C.; ARNASON, J. T. **Essential Oils in Insect Control: Low-Risk Products in a High-Stakes World**. Annual Review of Entomology, 2012.

REIS, T. V.; SACRAMENTO, C. K.; OLIVEIRA, F. F.; OLIVEIRA, R. A. **Potencialidade das folhas do craveiro-da-índia cultivados no sul da bahia para extração de óleos essenciais**. XLVI Congresso Brasileiro de Química. Anais...ABQ - Associação Brasileira de Química, 2006

REYES-JURADO, F.; VEGA, A. F.; RAMIREZ-CORONA, N.; PALOU, E.; LOPEZ-MALO, A. **Essential Oils: Antimicrobial Activities, Extraction Methods, and Their Modeling**. Food Engineering Reviews, v. 7, n. 3, p. 275–297, 2015.

RIBAS, M. C.; MANTOVANI, D.; AWADALLAK, J. A. B. D.; CANEVESI, R. L.; TAZINAFO, N. M.; CARDOZO-FILHO, L.; PALU, F.; da SILVA, E. A. **Study of candeia oil extraction using pressurized fluids and purification by adsorption process**. Journal of Supercritical Fluids, v. 92, p. 177–182, 2014.

RODRIGUEZ, J. M. F.; de SOUZA, A. R. C.; KRUGER, R. L.; BOMBARDELLI, M. C. M.; MACHADO, C. S.; CORAZZA, M. L. **Kinetics, composition and antioxidant activity of burdock (*Arctium lappa*) root extracts obtained with supercritical CO<sub>2</sub> and co-solvent**. Journal of Supercritical Fluids, v. 135, p. 25–33, 2018.

RODRÍGUEZ-SOLANA, R.; SALGADO, J. M.; DOMINGUEZ, J. M.; CORTES-DIEGUEZ, S. **Characterization of fennel extracts and quantification of estragole: Optimization and comparison of accelerated solvent extraction and Soxhlet techniques**. Industrial Crops and Products, v. 52, p. 528–536, 2014.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. **Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food**. Food Chemistry, v. 92, n. 2, p. 235-254, 2005.

RUDKE, A. R.; MAZZUTTIA, S.; ANDRADE, K. S.; VITALI, L.; FERREIRA, S. R. S. **Optimization of green PLE method applied for the recovery of antioxidante compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L.) shell**. Food Chemistry, v. 298, p. 125061, 2019.

RUTHVEN, D. M. **Principles of Adsorption and Adsorption Processes**. [s.l.: s.n.].

SAGISAKA, M.; OGIWARA, S. ONO, S.; JAMES, C.; YOSHIZAWA, A.; MOHAMED, A.; ROGERS, S. E.; HEENAN, R. K.; YAN, C.; PEACH, J. A.; EASTOE, J. **New Class of Amphiphiles Designed for Use in Water-in-Supercritical CO<sub>2</sub> Microemulsions**. Langmuir, v. 32, n. 47, p. 12413–12422, 2016.

ŞAHİN, S.; ŞAMLI, R. **Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology**. Ultrasonics Sonochemistry, 2013.

SAITO, K.; SJODIN, A.; SANDAU, C. D.; DAVIS, M. D.; NAKAZAWA, H.; MATSUKI, Y.; PATTERSON Jr, D. G. **Development of a accelerated solvent extraction and gel permeation chromatography analytical method for measuring persistent organohalogen compounds in adipose and organ tissue analysis.** Chemosphere, v. 57, n. 5, p. 373–381, 2004.

SALEHI, P.; SONBOLI, A.; EFTEKHAR, F.; NEJAD-EBRAHIMI, S.; YOUSEFZADI, M. **Essential oil composition, antibacterial and antioxidant activity of the oil and various extracts of *Ziziphora clinopodioides* subsp. *rigida* (BOISS.) RECH. f. from Iran.** Biological and Pharmaceutical Bulletin, v. 28, n. 10, p. 1892-1896, 2005.

SAMPAIO NETO, O. Z.; BATISTA, E. A. C.; MEIRELLES, A. J. A. **The employment of ethanol as solvent to extract Brazil nut oil.** Journal of Cleaner Production, v. 180, p. 866-875, 2018.

SANTOS, A. L.; CHIERICE, G. O.; ALEXANDER, K.; RIGA, A. **Characterization of the raw essential oil eugenol extracted from *Syzygium aromaticum* L.** Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, v. 96, n. 3, p. 821–825, 2009.

SANTOS, D. T.; VEGGI, P.C.; MEIRELES, M. A. A. **Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jabuticaba skins.** Journal of Food Engineering, v. 108, n. 3, p. 444-452, 2012.

SANTOS, K. A.; DA SILVA, E. A.; DA SILVA, C. **Ultrasound-assisted extraction of favela (*Cnidocolus quercifolius*) seed oil using ethanol as a solvent.** Journal of Food Processing and Preservation, n. March, p. 1–13, 2021.

SANTOS, K. A.; DE AGUIAR, C. M.; DA SILVA, E. A.; DA SILVA, C. **Evaluation of favela seed oil extraction with alternative solvents and pressurized-liquid ethanol.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 169, p.105125, 2020.

SANTOS, K. A.; FROHLICH, P. C.; HOSCHIED, J.; TIUMAN, T. S.; GONÇANVES, J. E.; CARDOZO-FILHO, L.; da SILVA, E. A. **Candeia (*Eremanthus erythropappus*) oil extraction using supercritical CO<sub>2</sub> with ethanol and ethyl acetate cosolvents.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 128, n. January, p. 323–330, 2017.

SANTOS, K. A.; GONÇALVES, J. E.; CARDOZO-FILHO, L.; DA SILVA, E. A. **Pressurized liquid and ultrasound-assisted extraction of  $\alpha$ -bisabolol from candeia (*Eremanthus erythropappus*) wood.** Industrial Crops & Products, v. 130, p.428-435, 2019.

SARAN, S.; MENON, S.; SHAILAJAN, S.; POKHARNA, P. **Validated RP-HPLC method to estimate eugenol from commercial formulations like Caturjata Churna, Lavangadi Vati, Jatiphaladi Churna, Sitopaladi Churna and clove oil.** J. Pharm. Res, v. 6, p.53-60, 2013.

SATO, T; IKEYAA, Y.; ADACHI, S.; YAGASAKI, K.; NIHEI, K.; ITOH. N. **Extraction of strawberry leaves with supercritical carbon dioxide and entrainers: Antioxidant capacity, total phenolic content, and inhibitory**

**effect on uric acid production of the extract**, Food and Bioproducts Processing, v.117, p. 160-169, 2019.

SEKAR, M.; SAKTHI, V.; RENGARAJ, S. **Kinetics and equilibrium adsorption study of lead(II) onto activated carbon prepared from coconut shell**. Journal of Colloid and Interface Science, v. 279, n. 2, p. 307–313, 2004.

SENA, L.C.S.; SANTOS, J. L. A.; ANDRADE, P. H. S.; BRITO, G. C.; LIRA, A. A. M.; LOBO, I. M.F. **Excipientes farmacêuticos e seus riscos à saúde: uma revisão da literatura**. Rev. Bras. Farm. Hosp. Serv. Saúde São Paulo, v.5, n. 4, p. 25-34, 2014.

SESSOU, P.; FAROUGOU, S.; DJENONTIN, S.; KANEHO, S. **Bioefficacy of Cymbopogon citratus essential oil against foodborne pathogens in culture medium and in traditional cheese wagashi produced in Benin**. International Research Journal of Microbiology (IRJM), v. 3, n. 12, p. 406–415, 2012.

SHAFI, P. M.; ROSAMMA, M. K.; REDDY, P. S. **Antibacterial activity of Syzygium cumini and Syzygium travancoricum leaf essential oils**. Fitoterapia, v. 73, n. 5, p. 414–416, 2002.

SHAN, B.; CAI, Y. Z.; SOL, M.; CORKE, H. **Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.53, n. 20, p. 7749-7759, 2005.

SIES, H.; STAHL, W.; SUNDQUIST, A. R. **Antioxidant Functions of Vitamins: Vitamins E and C, Beta-Carotene, and Other Carotenoids**. Annals of the New York Academy of Sciences, v.669, p. 7-20, 1992.

SINGH, S. P.; CHANDEL, V. S.; MONOHAR, R. **Dielectric study of clove oil**. Journal of Ayurveda and Integrative Medicine, v. 9, p. 53–56, 2018.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. **Analisis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent**. Methods in enzymology, v. 299, p. 152-178, 1999.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. J. **Colorimetry to total phenolics with phosphomolybdic acid reagents**. American journal of enology and viniculture, p. 144-158, 1965.

SMALLWOOD, I. **Solvent recovery handbook**. London, Great Britain: McGraw-Hill, 1993, 387 p.

SMITH, R. M. **Extractions with superheated water**. Journal of Chromatography A, v. 975, n. 1, p. 31–46, 2002.

SOFIA, S. H.; SUZUKI, K. M. **Comunidades de machos de abelhas euglossina (Hymenoptera: Apidae) em fragmentos florestais no sul do Brasil**. Neotropical Entomology, v. 33, n. 6, p. 693–702, 2004.

SOUZA, C. R. F.; BOTT, R. F.; OLIVEIRA, W. P. **Optimization of the Extraction of Flavonoids Compounds from Herbal Material using**



**Experimental Design and Multi-response Analysis.** Latin American Journal of Pharmacy, v. 26, n. 5, p. 682–690, 2007.

SPARKS, D.; HERNANDEZ, R.; ZAPPI, M.; BLACKWELL, D.; FLEMING, T. **Extraction of rice bran oil using supercritical carbon dioxide and propane.** JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 83, n. 10, p. 885–891, 2006.

SPRICIGO, C. B.; BOLZAN, A.; PINTO, L. T. **Mathematical modeling of nutmeg essential oil extraction by Liquid carbon dioxide.** Latin American Applied Research, v.31, p. 397-401, 2001.

SRIVASTAVA, A. K.; SRIVASTAVA, S. K.; SYAMSUNDAR, K. V. **Bud and leaf essential oil composition of Syzygium aromaticum from India and Madagascar.** Flavour and Fragrance Journal, v. 20, n. 1, p. 51–53, 2005.

STALIKAS, C. D. **Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids.** Journal of Separation Science, v. 30, n. 18, p. 3268–3295, 2007.

STEFFANI, E.; ATTI-SANTOS, A. C.; ATTI-SERAFINI, L.; PINTO, L. T. **Extraction of Ho-Sho (cinnamomum camphora nees and EBERM VAR. Linaloolifera fujita) essential oil with supercritical CO<sub>2</sub>: Experiments and modeling.** Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 23, n. 2, p. 259–266, 2006.

STEVANATO, N.; DA SILVA, C. **Radish seed oil: Ultrasound-assisted extraction using ethanol as solvent and assessment of its potential for ester production.** Industrial Crops and Products, 2019.

STRATIL, P.; KLEJDUS, B.; KUBÁŇ, V. **Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals.** Talanta, 2007.

SUGIHARTINI, N.; KURNIAWAN, M. F.; YUWONO, T. **Anti-inflammatory Activity of Syzygium Aromaticum Essential Oil in Emulgel, Jordan.** Journal of Pharmaceutical Sciences, v.13, n. 2, 2020.

SYAHARIZA, Z. A.; TORKAMANI, A. E.; NORZIAH, H. M.; MAHMOOD, W. A. K.; JULIANO, P. **Optimisation of pressurised liquid extraction for antioxidative polyphenolic compound from Momordica charantia using response surface methodology.** International Journal of Food Science and Technology, v. 52, n. 2, 2016.

TAAMALLI, A.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; BARRAJÓN-CATALÁN, E.; RUIZ-TORRES, V.; PÉREZ-SÁNCHEZ, A.; HERRERO, M.; IBAÑEZ, E.; MICOL, V.; ZARROUK, M.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. **Use of advanced techniques for the extraction of phenolic compounds from Tunisian olive leaves: Phenolic composition and cytotoxicity against human breast cancer cells.** Food and Chemical Toxicology, v. 50, p.1817-1825, 2012.

TAGLIAZUCCHI, D.; VERZELLONI, E.; BERTOLINI, D.; CONTE, A. **In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols.** Food Chemistry, v.120, n.2, p. 599-606, 2010.

TAKAO, L. K.; IMATOMI, M.; GUALTIERI, S. C. J. **Antioxidant activity and phenolic content of leaf infusions of Myrtaceae species from Cerrado (Brazilian Savanna).** Brazilian Journal of Biology, 2015.

TEKIN, K.; AKALIN, M. K.; ŞEKER, M. G. **Ultrasound bath-assisted extraction of essential oils from clove using central composite design.** Industrial Crops and Products, 2015.

TETIK, N.; YÜKSEL, E. **Ultrasound-assisted extraction of d-pinitol from carob pods using Response Surface Methodology.** Ultrasonics Sonochemistry, 2014.

TIWARI, B. K. **Ultrasound: A clean, green extraction technology.** TrAC - Trends in Analytical Chemistry, v. 71, p. 100–109, 2015.

TRIPODO, G.; IBÁÑEZ, E.; CIFUENTES, A.; GILBERT-LÓPEZ, B.; FANALI, C. **Optimization of pressurized liquid extraction by response surface methodology of Goji berry (*Lycium barbarum* L.) phenolic bioactive compounds.** Electrophoresis, p. 1-10, 2018.

TSIMOGIANNIS, D.; STAVRAKAKI, M.; OREOPOULOU, V. **Isolation and characterisation of antioxidant components from oregano (*Origanum heracleoticum*).** International Journal of Food Science and Technology, v. 41, n. SUPPL. 1, p. 39–48, 2006.

VAJIĆ, U. J.; Grujić-Milanović, Živković, J.; Šavikina, K.; Gođevac, D.; Miloradovića, Z.; Bugarski, B.; Mihailović- Stanojević, N. **Optimization of extraction of stinging nettle leaf phenolic compounds using response surface methodology.** Industrial Crops and Products, v. 74, p. 912-917, 2015.

VELLUTI, A. SANCHIS, V.; RAMOS, A. J.; EGIDO, J.; MARIN, S. **Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain.** International Journal of Food Microbiology, v. 89, n. 2–3, p. 145–154, 2003.

VINATORU, M.; MASON, T. J.; CALINESCU, I. **Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials.** TrAC - Trends in Analytical Chemistry, v. 97, p.159-178, 2017.

VOROBIEV, E.; LEOVKA, N. I. **Enhancing Extraction Processes in the Food Industry.** [s.l: s.n.].

VUONG, Q. V.; GOLDSMITH, C. D.; DANG, T. T.; NGUYEN, V. T.; SADEQZADEH, E.; SCARLATT, C. J.; BOWYER, M. C. **Optimisation of ultrasound-assisted extraction conditions for phenolic content and**

**antioxidant capacity from Euphorbia tirucalli using response surface methodology.** Antioxidants, v. 3, n. 3, p. 604–617, 2014.

WANASUNDARA, U. N.; SHAHIDI, F. **Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils.** Food Chemistry, v.63, n. 3, p. 335-342, 1998.

WANG, L.; WELLER, C. L. **Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants.** Trends in Food Science and Technology, v. 17, n. 6, p. 300–312, 2006.

WEI, M. C.; XIAO, J.; YANG, Y. C. **Extraction of  $\alpha$ -humulene-enriched oil from clove using ultrasound-assisted supercritical carbon dioxide extraction and studies of its fictitious solubility.** Food Chemistry, v. 2010, p. 172-181, 2016.

XIE, Y.; YANG, Z.; CAO, D.; RONG, F.; DING, H.; ZHANG, D. **Antitermitic and antifungal activities of eugenol and its congeners from the flower buds of Syzgium aromaticum (clove).** Industrial Crops and Products, v. 77, p.780-786, 2015.

XU, D. P.; ZHENG, J.; ZHOU, Y.; LI, Y.; LI, S.; LI, H-B. **Ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from the flower of Limonium sinuatum: Optimization and comparison with conventional methods.** Food Chemistry, v. 217, p. 552-559, 2017.

YINGNGAM, B.; MONSCHEIN, M.; BRANTNER, A. **Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Cratoxylum formosum ssp. formosum leaves using central composite design and evaluation of its protective ability against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death.** Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, v. 7, n. 1, p.S497-S505, 2014.

YUN, S. M.; LEE, M. H.; LEE, K. J.; KU, H. O.; FILHO, S. W.; JOO, Y. S. **Quantitative analysis of eugenol in clove extract by a validated HPLC method.** Journal of AOAC International, v. 93, n.6, p. 1806-1810, 2010.

YUN, S. M.; LEE, M. H.; LEE, K. J.; KU, H. O.; SON, S. W.; JOO, Y. S. **Quantitative analysis of eugenol in clove extract by a validated HPLC method.** Journal of AOAC International, v. 93, n. 3, 2010.

ZAIBUNNISA, A.H., NORASHIKIN, S., MAMOT, S., OSMAN, H. **An experimental design approach for the extraction of volatile compounds from turmeric leaves (Curcuma domestica) using pressurised liquid extraction (PLE).** LWT - Food Science and Technology, v. 42, p. 233-238, 2009.

ZHAO, S.; KWOK, K. C.; LIANG, H. **Investigation on ultrasound assisted extraction of saikosaponins from Radix Bupleuri.** Separation and Purification Technology, v. 55, n. 3, p. 307-312, 2007.

ZHAO, S.; ZHANG, D. **Supercritical fluid extraction and characterisation of Moringa oleifera leaves oil**. Separation and Purification Technology, v. 118, p. 497- 502, 2013.

ZULKAFI, Z. D.; WANG, H.; MIYASHITA, F.; UTSUMI, N.; TAMURA, K. **Cosolvent-modified supercritical carbon dioxide extraction of phenolic compounds from bamboo leaves (Sasa palmata)**. Journal of Supercritical Fluids, v. 94, p. 123–129, 2014.

## 8 ANEXOS

### 8.1 ANEXO I - Artigos Publicados em Periódicos

Artigos publicados que reportam o conteúdo desta tese:

FROHLICH, P. C., SANTOS, K. A., HASAN, S. D. M., da SILVA, E. A. **Evaluation of the ethanolic ultrasound-assisted extraction from clove (*Syzygium aromaticum*) leaves and chemical characterization of the extracts.** *Food Chemistry*, 373, (2022) 131351.

FROHLICH, P. C., SANTOS, K. A., ASCARI, J. REFATI, J. R. S., PALÚ, F. CARDOZO-FILHO, L., da SILVA, E. A. **Antioxidant compounds and quantification of Eugenol from extracts of clove (*Syzygium aromaticum*) leaves by pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction.** *The Journal of Supercritical Fluids*, 196, (2023) 105865.